

Emmi Koskela

Kitinaasien tuotto *Trichoderma reesei* -homeessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

11.4.2016

Tekijä(t) Otsikko	Emmi Koskela Kitinaasien tuotto <i>Trichoderma reesei</i> -homeessa
Sivumäärä Aika	38 sivua + 2 liitettä 11.4.2016
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaaja(t)	Erikoistutkija Marja Paloheimo Lehtori Tiina Soininen
<p>Tämä insinöörityö tehtiin yhteistyössä Roal Oy:n T&K-osaston kanssa. Tarkoituksena oli löytää kitinaaseja, joita Roal Oy voisi tulevaisuudessa hyödyntää teollisessa tuotannossaan.</p> <p>Kitinaasit ovat hydrolyyttisiä entsyymejä, jotka pilkkovat kitiiniä hajottamalla sen <i>N</i>-asetyylliglukosaminiyksiköiden välisiä β-1,4-glykosididoksia. Kitiini on luonnossa runsaasti esiintyvä polymeeri. Sitä on paljon esimerkiksi äyriäisten ja hyönteisten tukirangoissa sekä homeiden soluseinissä.</p> <p>Tämän työn tavoitteena oli kloonata kitinaasigeenejä homeen genomista ja tuottaa niiden koodittamia kitinaaseja <i>Trichoderma reesei</i> -homeessa. Työhön kuului kitinaasituotokasettien rakentaminen, niiden transformointi tuottoisääntään, transformanttien kasvatus ja valitun kitinaasin ominaisuuksien alustava karakterisointi tuottokannan kasvuliuoksesta. Lisäksi työssä testattiin analyysimenetelmiä, joilla kitinaasien aktiivisuuksia ja ominaisuuksia voidaan tutkia.</p> <p>Tässä työssä kitinaasigeenejä kloonattiin kuusi kappaletta, joista neljän koodaamat kitinaasientsyymit tuottuivat <i>T. reesei</i> -homeesta. Proteiinien erittyminen kasvuliuokseen todennettiin SDS-PAGE-analyysillä. Yhden hyvin tuottuvan kitinaasin, Chi18-13:n, ominaisuudet analysoitiin. Työssä määritettiin Chi18-13:n pH- ja lämpötilaoptimit sekä sen spesifisyys pienikokoisille kitiinisubstraateille.</p> <p>Tulokset osoittavat, että Chi18-13:n pH-optimi on välillä 3 - 4 ja lämpötilaoptimi välillä 50 - 60 °C. Chi18-13 hajottaa kitosaania, ja sillä on sekä endo- että eksokitinaasiaktiivisuutta. Tuotettujen kitinaasien karakterisointia jatketaan Roal Oy:ssä parhaiten teolliseen käyttöön soveltuvien kitinaasien löytämiseksi. Lisäksi analyysimenetelmien kehittämistä jatketaan, jotta löydetään soveltuvimmat menetelmät erilaisten kitinaasien ominaisuuksien määrittämiseksi ja kitinaasien välisten synergioiden selvittämiseksi.</p>	
Avainsanat	Kitinaasi, kitiini, <i>Trichoderma reesei</i>

Author(s) Title	Emmi Koskela Producing chitinases in <i>Trichoderma reesei</i>
Number of Pages Date	38 pages + 2 appendices 11 April 2016
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Bio and Food Engineering
Instructor(s)	Marja Paloheimo, Senior Research Scientist Tiina Soininen, Lecturer
<p>This thesis was done in collaboration with the R&D department of Roal Oy. The aim of Roal is to find chitinases which can be exploited in the future industrial production.</p> <p>Chitinases are hydrolytic enzymes that degrade chitin by cleaving the β-1,4-glycosidic bonds between its structural <i>N</i>-acetylglucosamine units. Chitin is an abundant natural polymer. It is found, for example, in the exoskeletons of crustaceans and insects and in the fungal cell walls.</p> <p>The aim of this thesis was to clone chitinase genes from the genome of a filamentous fungus, and to produce the encoded chitinases in <i>Trichoderma reesei</i>. The work included construction of chitinase expression cassettes, transformation of the cassettes into the host, cultivations of the transformants, and initial characterization of a selected chitinase. In addition, analytical methods were tested for examination of chitinase activities and features.</p> <p>In this thesis, six individual chitinase genes were cloned and expressed in <i>T. reesei</i>. Four out of these six chitinases could be produced by the host. The production of enzymes was verified by SDS -PAGE analysis. In this thesis, one of the chitinases, Chi 18-13, was characterized for its specificity for small chitin substrates and its pH and temperature optimal were defined.</p> <p>According to the results obtained the pH optimum of the Chi18-13 is between 3 and 4, and the temperature optimum is between 50 and 60 °C. Chi18-13 can degrade chitosan and has both endo- and exochitinase activity. The characterization of the produced chitinases will continue at Roal Oy in order to identify the best suited chitinases for industrial use. In addition, the development of the analytical methods will continue to screen for the most appropriate methods to characterize various chitinases and their synergies with each other.</p>	
Keywords	Chitinase, chitin, <i>Trichoderma reesei</i>

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
	KIRJALLINEN OSA	2
2	Kitiini ja kitinaasit	2
2.1	Kitiini	2
2.2	Kitinaasit	3
2.2.1	Luokittelu ja rakenne	4
2.2.2	<i>Trichoderma reesei</i> kitinaasit	5
2.2.3	Kitinaasien analytiikka	7
2.2.4	Teolliset sovellukset	7
3	Teollisten entsyymien tuotto <i>Trichoderma reesei</i> -homeessa	8
	KOKEELLINEN OSA	10
4	Materiaalit ja menetelmät	10
4.1	Mikrobikasvatukset	10
4.1.1	<i>Escherichia coli</i> -kasvatukset	10
4.1.2	<i>Trichoderma reesei</i> -kasvatukset	10
4.2	Molekyylibiologian menetelmät	11
4.2.1	Polymeraasiketjureaktio (PCR)	11
4.2.2	Palojen ligointi tuottovektoriin ja <i>E. coli</i> -transformaatio	13
4.2.3	Plasmidieristykset, liitosalueiden ja geenien tarkistus	14
4.2.4	Tuottokasettien irrottaminen ja puhdistus geeliltä	16
4.3	<i>Trichoderma reesei</i> -transformaatio ja transformanttien käsittely	16
4.4	Analyysit	17
4.4.1	SDS-PAGE	17
4.4.2	Proteiinimääritys	17
4.4.3	Entsyymiaktiivisuuksien analysointi	18

5	Tulokset ja tulosten tarkastelu	19
5.1	Kitinaasituottokasettien rakentaminen	20
5.2	<i>Trichoderma reesei</i> -transformaatio ja transformanttien käsittely	21
5.3	Analyysit	22
5.3.1	Kasvuliuksien analysointi	22
5.3.2	Kitinaasin ominaisuuksien määrittäminen	24
6	Yhteenveto	34
	Lähteet	36
	Liitteet	
	Liite 1. Digestiotuotteet	
	Liite 2. PCR- ja sekvensointialukkeet	

Lyhenteet

GlcNAc	<i>N</i> -asetyyli-glukosamiini, kitiinin rakenneyksikkö
PD	Potato dextrose -kasvatusalusta. Rikas alusta homeen kasvattamiseen.
LB	Luria Bertani -kasvatusalusta. Rikas alusta <i>Escherichia coli</i> -kantojen kasvattamiseen.
PCR	Polymerase chain reaction. Polymeraasiketjureaktio.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo. Eliön geneettinen materiaali.
T&K	Tutkimus- ja tuotekehitys
rpm	Rounds per minute. Kierrosta minuutissa
SDS-PAGE	Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi
CBM	Carbohydrate binding module. Substraattiin sitoutuva alue.
ER	Endoplasminen kalvosto
GlcN	D-glukosamiini, Kitiinin ja kitosaanin rakenneyksikkö

1 Johdanto

Kitinaasit ovat hydrolyyttisiä entsyymejä, jotka pilkkovat kitiinin rakenteellisten *N*-asetyyli-glukosamiiniryhmien välisiä glykosididoksia. Kitiiniä esiintyy runsaasti esimerkiksi äyriäisten ja hyönteisten tukirangoissa sekä sienten soluseinissä, ja sen oletetaan olevan luonnossa selluloosan jälkeen toiseksi yleisin polymeeri. Tämän vuoksi kitinaaseille on useita mahdollisia käyttötarkoituksia ja kitinaasien tutkimus on viime vuosina lisääntynyt. Kitinaaseja tuottavat useat homeet, virukset, bakteerit, kasvit ja eläimet. Tässä insinööriyössä keskitytään sieniperäisiin kitinaaseihin (engl. fungal chitinases) (1, s. 345 - 360).

Tämä insinööriyö tehtiin Roal Oy:n tutkimus- ja tuotekehitysosastolla. Roal Oy on bioteknologiayritys, joka tuottaa ja kehittää teollisia entsyymejä rehu-, elintarvike-, pesuaine-, bioetanoli-, tekstiili ja sellu- ja paperiteollisuuden sovelluksiin. Roal Oy on Alkon ja saksalaisen Röhm GmbH:n vuonna 1991 perustama yritys, jonka nykyisin omistavat brittiläinen Associated British Foods ja Altia. Roalin pääkonttori ja tuotantolaitos sijaitsevat Rajamäellä (2). Rajamäen tutkimus- ja tuotekehitysosastoon kuuluvat geeniteknikan laboratorio, fermentointi- ja formulointiyksikkö.

Insinööriyön tavoitteena oli tuottaa kitinaaseja *Trichoderma reesei* -homeessa ja karakterisoida näistä yksi hyvin tuottunut entsyymi. Roal Oy testaa myöhemmin sovelluskokeissa niihin valitsemiaan kitinaaseja ja tarkoituksena on, että tulevaisuudessa Roal Oy voisi hyödyntää ja tuottaa kitinaaseja teollisessa mittakaavassa. Lisäksi työn tavoitteena oli testata analyysimenetelmiä, joita käyttäen kitinaasien tuottoa ja ominaisuuksia voitaisiin jatkossa analysoida Roal Oy:n T&K-laboratoriossa.

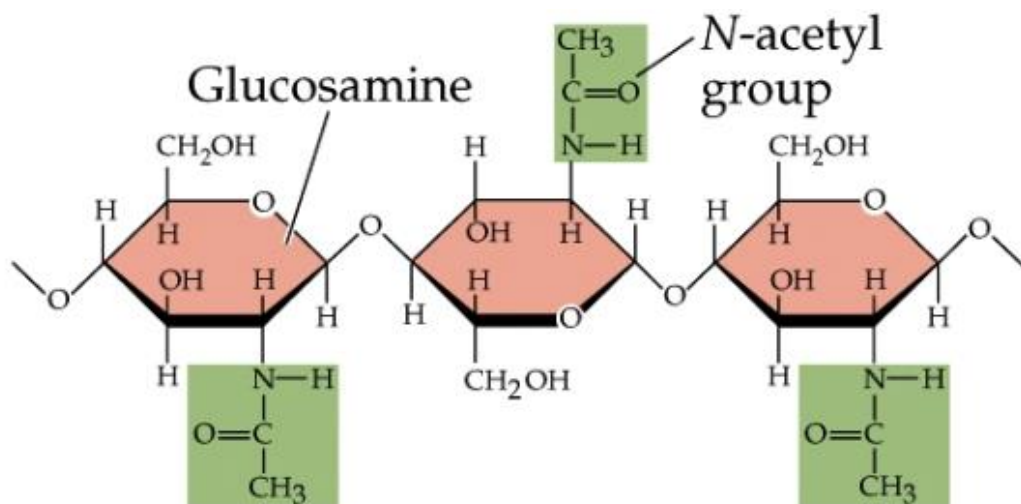
Työ sisältää kirjallisen osan, jossa käsitellään kitiinin ja kitinaasien teoriaa ja *Trichoderma reesei* -käyttöä teollisten entsyymien tuottajana. Kokeellisessa osuudessa tuotettiin kitinaaseja *T. reesei* -homeessa käyttäen molekyyli- ja mikrobiologian perustekniikoita. Kokeellinen osa sisälsi myös *T. reesei* -kasvuliuoksien analysoinnin, kitinaasin analyysimenetelmien testausta ja valitun kitinaasin ominaisuuksien karakterisointityötä.

KIRJALLINEN OSA

2 Kitiini ja kitinaasit

2.1 Kitiini

Kitiini on polysakkaridi, joka koostuu useista kovalenttisesti β -1,4-linkittyneistä *N*-asetyyli-glukosamiiniyksiköistä (GlcNAc) (kuva 1). Kitiinin kemiallinen kaava on $(C_8H_{13}O_5N)_n$. Kitiiniä esiintyy luonnossa runsaasti. Sen uskotaan olevan selluloosan jälkeen toiseksi yleisin ja uusiutuvin polymeeri luonnossa. (1, s. 345 - 360.)



Kuva 1. Kitiinin kemiallinen rakenne. Vihreällä taustavärillä merkitty rakenne kuvaa *N*-asetyyli-ryhmää ja punaisella taustavärillä merkitty rakenne kuvaa glukosamiiniyksikköä. (3.)

Kitiini on tärkeä osa niveljalkaisten, kuten äyriäisten ja hyönteisten, tukirangassa ja nilviäisten kotiloissa sekä sienien soluseinässä, jossa kitiiniä on 22 - 44 % (4, s. 833 - 846). Kitiini on materiaalina kevyttä, mutta hyvin kestävä (5, s. 4393 - 4412). Kitiinistä on monia johdannaisia, joita käytetään esimerkiksi kosmetiikassa kosteuden sitomiskyvyn vuoksi, veden puhdistuksessa sitomaan hienojakoisia partikkeleita suodattamisen helpottamiseksi ja lääketieteellisissä sovelluksissa kirurgisena lankana haavojen hoidossa. Sovelluksiin kitiiniä eristetään teollisesti pääosin äyriäisjätteestä. (6, s. 5923 - 5939.)

Kitiiniä esiintyy luonnossa kahdessa eri muodossa: α -kitiininä, jossa vierekkäiset kitiiniketjut ovat järjestäytyneet toisiinsa nähden vastakkaissuuntaisesti ("antiparalleli") ja

β -kitiiniä, jossa vierekkäisten ketjujen suunta on toisiinsa nähden sama ("parallel") (7, s. 21 - 29). α -kitiini on runsain kitiini luonnossa ja sitä esiintyy muun muassa ravuissa ja katka-ravuissa. Noin 75 % rapujen ja katkarapujen osista luetaan jätteeksi, ja tällaisen jätteen kuivapainosta kitiini kattaa 20 - 58 %. β -kitiiniä on luonnossa muun muassa mustekalojen sisäisessä tukirakenteessa. (8, s. 71 - 81.)

2.2 Kitinaasit

Kitinaasit ovat hydrolyyttisiä kitiiniä hajottavia entsyymejä. Kitinaaseilla on laaja käyttö-potentiaali erilaisiin sovelluksiin, koska kitiiniä esiintyy monessa luonnon materiaalissa ja jätemateriaalissa. Viime vuosina kitinaasien molekyyli-tason tutkimus on edennyt huomasti, kun julkisia genomisekvenssejä on runsaasti saatavilla. (1, s. 345 - 360.)

Kitinaasi hajottaa kitiinin β -1,4-glykosidisidoksia (6, s. 5923 - 5939). Kitiinin hajottami-nen tapahtuu kah-dessa vaiheessa. Endokitinaasit katkaisevat kitiinin satunnaisesti muodostaen liukoisia, eripituisia β -(1, 4)-*N*-asetyyli-glukosamiinin oligosakkarideja (kuva 2). Toisessa vaiheessa eksokitinaasit (kitiini-1,4- β -kitobiosidaasit) pilkkovat kitiiniketjun pelkistävästä päästä disakkarideja (GlcNAc)₂ ja jatkavat kitiinioligosakkaridien hajotta-mista *N*-asetyyli-glukosamiinimonosakkarideiksi (β -*N*-asetyyliheksosaminidaasit). (7, s. 21 - 29.)

tinaasiaktiivisuutta omaavista entsyymeistä käytetään yleisesti ”kitinaasi”-nimitystä, vaikka eksokitinaasit osallistuvatkin osaltaan kitiinisubstraatin hajottamiseen di- ja monosakkarideiksi (10, s. 73 - 99).

Tunnetut endokitinaasit kuuluvat entsyymiperheisiin GH18 ja GH19 (6, s. 5923 - 5939). Näiden kahden perheen kitinaasit eroavat aminohapposekvensseiltään, kolmiulotteiselta rakenteeltaan ja entsyymaattiselta mekanismltaan. Kaikki tällä hetkellä tunnetut sieniperäiset kitinaasit kuuluvat perheeseen GH18. Tunnetut perheen GH19 kitinaasit ovat lähinnä kasvien kitinaaseja. (11, s. 73 - 99.)

Sieniperäiset kitinaasit jaetaan kolmeen alaryhmään. A-ryhmä sisältää eksokitinaaseja, jotka osallistuvat soluseinän muokkaukseen kasvun ja autolyysin aikana. Niiden molekyylimassa on 40 - 60 kDa. Ryhmään B kuuluu endokitinaaseja, joiden koko on 30 - 50 kDa, ja ne osallistuvat kitiinien hajottamiseen homeen ravinnoksi ja/tai muiden homeiden soluseinän hajottamiseen (mykoparatisismi). Ryhmä C sisältää molekyylimassaltaan suuria entsyymejä (120 - 200 kDa), joiden oletetaan olevan aktiivisuudeltaan eksokitinaaseja. Ryhmän C kitinaasien aminohapposekvenssien perusteella niiden rakenteessa on samankaltaisuuksia *Kluyveromyces lactis* -hiivan ”killer toxin” -rakenteiden kanssa. (11, s. 73 - 99.)

Osa GH18-ryhmän kitinaaseista on erittyviä eli niillä on signaalipeptidi. Osalla GH18-kitinaaseista on rakenteessaan substraattiin sitoutuva alue (”CBM”, carbohydrate binding module) ja sen katalyyttiseen alueeseen liittävä linkkerialue, mutta osa kitinaaseista on solun sisäisiä proteiineja. Vaikka eri kitinaasien aminohapposekvenssit ovat hyvin erilaisia, niiden substraattia sitovien alueiden sekvensseissä on samankaltaisuutta. Joillakin kitinaaseilla on rakenteissaan alueita (”GPI-ankkuri”), joiden avulla ne todennäköisesti ankkuroituvat soluseinään tai membraaniin. Näiden kitinaasien toiminnan oletetaan liittyvän solun morfogeneesiin. (1, s. 345 - 360.)

2.2.2 *Trichoderma reesei* kitinaasit

Trichoderma reesei genomisekvenssistä on annotoitu 18 eri GH18-ryhmän kitinaasia koodittavaa geeniä. Näistä 17 voidaan luokitella yllä mainittuihin ryhmiin A, B ja C (taulukko 1). Chi18-15:n aminohapposekvenssille ei löydy samankaltaisuuksia muiden sieniperäisten kitinaasien kanssa. Sen aminohapposekvenssillä on samankaltaisuutta gram-positiivisen *Streptomyces*-bakteerista peräisin olevan kitinaasin sekvenssiin, jo-

ten Chi18-15:n oletetaan olevan peräisin evoluution aikana tapahtuneesta geenisiirrosta bakteerista homeeseen. (6, s. 5923 - 5939.)

Taulukko 1. *Trichoderma reesei*:n kitinaasit ja niistä julkaistuja tietoja (6, s. 5923 - 5939).

Kitinaasi	Ryhmä	pI	Molekyyli massa (kDa)	Oletettu sijainti solussa
Chi18-1	C	3,97	146,5	Erittyvä
Chi18-2	A	4,05	44,5	Sytoplasma
Chi18-3	A	4,15	38,7	Mitokondrio
Chi18-4	A	4,16	44,2	ER
Chi18-5	A	4,39	46,0	Erittyvä
Chi18-6	A	4,64	54,2	Erittyvä
Chi18-7	C	4,68	44,6	Sytoplasma
Chi18-8	C	4,80	139,1	Erittyvä
Chi18-9	C	4,81	163,2	Erittyvä
Chi18-10	A	4,96	136,1	Erittyvä
Chi18-11	B	5,18	41,5	Erittyvä
Chi18-12	B	5,18	35,0	Erittyvä
Chi18-13	B	5,36	41,0	Erittyvä
Chi18-14	B	5,44	42,6	Erittyvä
Chi18-15	-	5,84	36,2	Erittyvä
Chi18-16	B	6,31	41,9	Erittyvä
Chi18-17	B	6,41	41,4	Erittyvä
Chi18-18	A	9,69	104,2	Erittyvä tai soluseinä

Trichoderma reesei:n kitinaaseista tiedetään vielä hyvin vähän, sillä julkaisuja niiden ominaisuuksien biokemiallisesta karakterisoinnista ei ole. Entsyymien oletetut ominaisuudet perustuvat sekvenssien perusteella muodostettuun tietoon.

Kitinaasit on nimetty Biochemical Nomenclature -komission sääntöjen mukaan. Ensin kitinaasien nimessä on Chi18. Chi on yleinen kitinaaseja tarkoittava lyhenne, ja numero

18 sen perässä kertoo, että kitinaasi kuuluu hydrolaasiperheeseen GH18. (6, s. 5923 - 5939.)

2.2.3 Kitinaasien analytiikka

Kitinaasien analytiikka on osoittautunut hyvin haasteelliseksi. Puhdistettujen yksittäisten kitinaasien aktiivisuus tietylle substraatille voi olla hyvin alhainen tai aktiivisuutta ei saada mitattua. Useissa tapauksissa kitiinisubstraatin hajottaminen vaatii vähintään kahden kitinaasin yhtäaikaisen toiminnan. Synergiat voivat myös olla useamman kuin kahden kitinaasin välisiä, mikä vaikeuttaa yksittäisten molekyylien ominaisuuksien karakterisointityötä. (1, s. 345 - 360.)

Lisäksi kitinaasien ominaisuuksien analysoinnin haastetta lisää, että kitinaasien aktiivisuus puhdistetuille kitiinisubstraateille ja kitiinijohdannaisille saattaa poiketa niiden aktiivisuudesta luonnon kitiinille. Siten laboratorio-olosuhteissa saadut aktiivisuustulokset eivät välttämättä ole verrattavissa entsyymien toimintaan esimerkiksi teollisessa soveluksessa.

2.2.4 Teolliset sovellukset

Kitinaasien suuresta sovelluspotentiaalista huolimatta niitä ei ole vielä käytetty teollisesti yhtä suurella mittakaavalla kuin esimerkiksi proteaaseja, sellulaaseja ja amylaaseja (4, s. 833 - 846). Kitinaaseille on kuitenkin monia mahdollisia käyttötarkoituksia ja niiden uskotaan tulevaisuudessa olevan hyödyksi monella teollisuuden alalla, muun muassa jätteiden käsittelyssä, rehu-, elintarvike- ja lääketeollisuudessa sekä kasvien suojelussa (12, s. 35 - 45).

Tulevaisuuden elintarvikkeiden ja rehujen proteiinilähteinä tai rinnalla nykyisten proteiinilähteiden kanssa on mainittu muun muassa levät, hyönteiset ja toukat. Kitinaasien avulla hyönteisproteiinia voitaisiin saada hyödynnettyä tehokkaammin ja hyönteisproteiineista voitaisiin valmistaa esimerkiksi proteiinijauheita, sillä hyönteisten sisältämä proteiini saataisiin paremmin käyttöön, kun kitiinistä muodostunut kuori saataisiin hajotettua. (13).

Kasvien suojelussa kitinaasien uskotaan olevan apuna patogeenisiä sienikasveja vastaan (14). Kitinaaseja erittäviä homeita, esimerkiksi *Trichoderma harzianum* -homeita, käytetään kasvien suojelussa estämään muita homeita infektoimasta kasvia (15, s. 67 - 76). Elintarviketeollisuudessa kitinaaseja voisi mahdollisesti käyttää luonnollisena säilöntäaineena. Lääketeollisuudessa ne ovat potentiaalisia kolesterolin alentumiseen vaikuttavia tekijöitä sekä lääkekäytössä mahdollisia molekyylejä sieniperäisiä sairauksia vastaan. (16.)

Kitinaasien nykyistä laajempi hyödyntäminen teollisissa sovelluksissa vaatii lisää tutkimusta ja sovelluksiin sopivimpien entsyymien ja entsyymiyhdistelmien testausta. Sovelluksiin sopivien kitinaasien seulonta on haasteellista, koska kitinaasien aktiivisuus puhdistetuille kitiinisubstraateille ei välttämättä kuvasta niiden toimintaa sovelluksessa käytettäville kitiineille tai kitiinijohdannaisille (ks. luku 2.2.3).

3 Teollisten entsyymien tuotto *Trichoderma reesei* -homeessa

Teollisia entsyymejä käytetään monissa sovelluksissa, esimerkiksi elintarvike-, pesuaine-, rehu- ja tekstiiliteollisuudessa. Näiden lisäksi monet lääkkeet ovat entsyymejä. (17.) *Trichoderma reesei* on mesofiilinen filamentthome, joka lisääntyy suvuttomasti ja on hyvin tärkeä solutehdas entsyymiteollisuudessa (18, s. 2167 - 2174).

T. reesei on alun perin eristetty toisen maailmansodan aikana Solomon saarilta ja sen alkuperäinen nimitys oli *Trichoderma viride*. USA:n armeijan tutkimus- ja kehityskeskuslaboratorio eristi alkuperäisen QM6a-kannan. Koska *T. reesei* on luonnostaan hyvä sellulaasien tuottaja, se hajotti armeijan puuvillakankaisia telttoja ja vaatteita (19, s. 58 - 68), joten tutkijoissa heräsi kiinnostus käyttää sitä teollisena sellulaasiseosten tuottajana. Alkuperäisestä QM6a-kannasta tehtiin 1970-luvun öljykriisin aikoihin lukuisia entsyymituotoltaan parantuneita mutanttikantoja. Kantojen muokkaus tapahtui esimerkiksi UV-valolla tai mutageenisillä kemikaaleilla. (20, s.343 - 354.) Kannan muokkauksien aloittamisesta lähtien *T. reesei* on ollut kasvavasti käytössä omien entsyymien tuottamiseksi esimerkiksi rehu- ja tekstiiliteollisuudella. *T. reesei*:n käyttö teollisena entsyymien tuottoisäntänä yleistyi 1980-luvun puolella välissä, kun geneettisen tutkimuksen työkalut kehittyivät. (21.) Geneettinen muokkaus mahdollisti korkeammat entsyymisaannot ja myös vierasperäisten entsyymien tuoton *Trichodermassa*. *T. reesei*:n genomin koko on 33 Mb, ja sen koko genomi on sekvensoitu. (18, s. 2167 - 2174.)

T. reesei:ssä entsyymituotteen valmistamiseksi käytettävät tuottokasetit sisältävät geenin, joka koodaa haluttua proteiinia, ja se liitetään yleensä *T. reesei*:n *cbh1* -promootoriin (22, s. 291 - 308). Tämä promootori säätelee sellobiohydraasi I (CBHI)-sellulaasia koodaavan geenin ilmentymistä. Promootori on vahva: homeen genomissa on ainoastaan yksi CBHI-proteiinia koodaava geeni, ja villityyppisissä kannoissa CBHI-proteiini muodostaa noin 50 % kaikista kannan erittämistä proteiineista. (23, s. 49 - 68.) Lisäksi tuottokasetti sisältää geenin ilmentymisen lopettavan terminaattorijakson ja transformaation merkkigeenin transformanttipesäkkeiden seulomiseksi (22, s. 291 - 308).

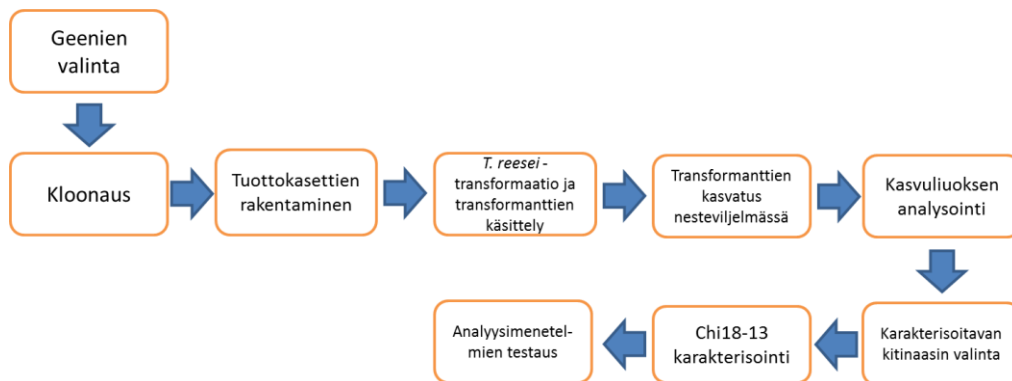
T. reesei ei tuota toksiineja ja siksi se on turvallinen käyttää. Se kuuluu mikrobien bioturvallisuusluokkaan 1. Sen käyttö teollisena tuotanto-organismina on mahdollista, sillä sen kasvatuksessa käytettävät raaka-aineet ovat halpoja ja helposti saatavilla ja kasvatusta on mahdollista toteuttaa isossa mittakaavassa. Lisäksi *T. reesei* erittää tuottamansa proteiinit kasvatusalustaan, josta tuote on solujen poiston jälkeen helppo käsitellä. (24, s. 365 - 379.) Suurin osa teollisista entsyymeistä tuotetaan geneettisesti muokatuissa mikro-organismeissa, sillä näin saadaan tietyn entsyymin tuottoon erikoistuneita isäntäkantoja ja entsyymien tuottotasot mahdollisimman korkeiksi (21).

Entsyymien teollinen tuotanto toteutetaan yleisimmin suurissa 40 - 400 m³:n kokoisissa bioreaktoreissa nesteviljelynä. Teollisesti tuotettuja entsyymejä myydään erikokoisissa pakkauksissa, ja tuotteiden hinnat riippuvat entsyymin konsentraatiosta, lähteestä ja hyödystä asiakkaalle. (21.)

KOKEELLINEN OSA

4 Materiaalit ja menetelmät

Työn kokeellinen osuus kesti useita viikkoja johtuen *T. reesei* -homeen pitkistä kasvatusajoista. Alla olevassa prosessikaaviossa (kuva 3) on kuvattuna työn eri vaiheet.



Kuva 3. Työn vaiheet prosessikaaviossa esiteltynä.

4.1 Mikrobikasvatukset

4.1.1 *Escherichia coli* -kasvatukset

E. coli -isäntänä käytettiin XL1-Blue -soluja (Agilent Technologies, US). Transformaatiot kompetentteihin soluihin tehtiin solujen valmistajan ohjeiden mukaisesti. *E. coli* -kasvatukset tehtiin yön yli 37 °C:ssa. Kasvatusmaljoissa ja -liemessä alustana oli Luria-Bertani -alusta, johon lisättiin 100 µg/ml ampisilliiniä kantoihin siirretyn plasmidin stabiilisuuden varmistamiseksi. Liemikasvatukset tehtiin 50 ml:n tilavuudessa 250 ml:n erlenmeyerpullossa ja 250 rpm:n ravistelussa.

4.1.2 *Trichoderma reesei* -kasvatukset

T. reesei -kannat kasvatettiin kiinteillä alustoilla 28 °C:ssa noin 7 vrk tai kunnes maljoille oli kasvanut selkeitä itiöiviä pesäkkeitä ja vinopinnoilla oli vahva itiöinti. Kasvatukset tehtiin päivänvalokaapissa itiöinnin edistämiseksi. Transformantit maljattiin selektioalustalle, joka oli *Trichoderma*-minimialusta, johon oli lisätty sorbitolia (protoplastien stabilointi), asetamidia (selektioiva typenlähde) ja CsCl:a (taustakasvun esto). Trans-

formantit poimittiin selektioalustalle, joka oli *Trichoderma*-minimialusta asetamidi- ja CsCl-lisäyksillä. Kantojen puhdistus tehtiin hajotus- ja selektioalustalla, johon oli lisätty 10 % Triton X-100 -liuosta pitämään homepesäkkeet erillä toisistaan. *Trichoderma*-transformanttikantojen käsittelyssä käytetyt alustat sisälsivät asetamidia ainoana typpilähteenä. Isäntäkanta ei pysty kasvamaan asetamidi tyypinlähteenään, ja näin ollen alustoilla kasvaa ainoastaan transformantteja, jotka pystyvät niihin siirretyn *amdS*-geenin tuotteen avulla hyödyntämään asetamidin. (25, s. 155 - 164; 26, s. 515 - 522.) Isäntäkanta ja puhdistetut transformantit kasvatettiin ja itiöitettiin PD-vinopinnoilla (Difco, US).

Nesteviljelmissä kasvatusalustana käytettiin sellulaaseja ja siten myös *cbh1*-promootoria indusoivaa kompleksista alustaa (27, s. 223 - 228). Alustan pH oli 5,5. *T. reesei* -kantoja kasvatettiin 50 ml:n nestetilavuudessa 250 ml:n erlenmeyerpulloissa 30 °C:ssa 250 rpm:n ravistelussa. Itiöt nesteviljelmiin kerättiin PD-vinopinnoilta suspendoimalla ne 5 ml:aan 0,09 % NaCl - 0,01 % Tween80-liuosta. Nestekasvatuksen kesto oli seitsemän vuorokautta. Nestekasvatuksissa oli normaali päivänvalo - yövalo -rytmi.

4.2 Molekyylibiologian menetelmät

DNA:n käsittelyssä käytetyt restriktioentsyymit olivat joko Thermo Scientificiltä (EU) tai New England BioLabsilta (US). DNA-palat puhdistettiin reaktioseoksista ja geeliltä käyttäen GeneJET Gel Extraction -kittiä (Thermo Scientific, Liettua). Geelijaissa käytettiin 1 % agarosigeeliä (BioNordika, EU).

Plasmidien eristykset tehtiin käyttäen GeneJet Plasmid Miniprep -kittiä (Thermo Scientific, Liettua) tai Plasmid Midi -kittiä (Qiagen, Saksa). PCR- ja sekvensointireaktioissa käytetyt alukkeet tilattiin Sigmaalta (Sigma Aldrich, UK). DNA-pitoisuudet mitattiin spektrofotometrillä (NanoVue Plus, GE Healthcare Life Sciences).

4.2.1 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

Kitinaasigeenit syntetisointiin PCR-reaktiolla käyttäen templaattina noin 1 µg valmiiksi eristettyä *T. reesei* Rut-C30 genomista DNA:ta ja polymeraasina NEB Q5-entsyymiä (New England BioLabs, US). Reaktiot tehtiin kahdessa eri alukkeiden kiinnityslämpötilassa. Reaktioiden ohjelma oli seuraava:

1. 98°C 30 s (denaturaatio)
2. 98°C 10 s (denaturaatio)
3. 60 ja 65 °C 30 s (alukkeiden kiinnitys)
4. 72°C 60 s (ekstensiovaihe)
5. Toistetaan 24 kertaa syklit 2 - 4
6. 72°C 2 min (loppuekstensio)
7. 4°C

Reaktiossa käytettyjen alukkeiden sekvenssit löytyvät taulukosta 2 ja tarkemmat tiedot liitteestä 2. Alukkeita käytettiin reaktiossa 0,5 µM. PCR-reaktiossa käytetyt alukkeet oli suunniteltu siten, että niiden 5'-päässä (koodaava juoste) oli ensin vektorissa olevan cbh1-promoottorin sekvenssiä ja promoottorin loppuosan sekvenssi ja sen jälkeen kitinaasigeenin sekvenssiä geenin alusta. Alukkeen 3'-päässä (vastakkainen juoste) oli vektorin liitosalueen sekvenssiä ja sen jälkeen kitinaasigeenin loppuosan sekvenssiä (liite 2). Alukkeet sekvenssointia varten valittiin geenien alueelta niin, että niiden avulla saatiin sekvensoitua koko geeni ja vektorin ja inserttien väliset liitosalueet.

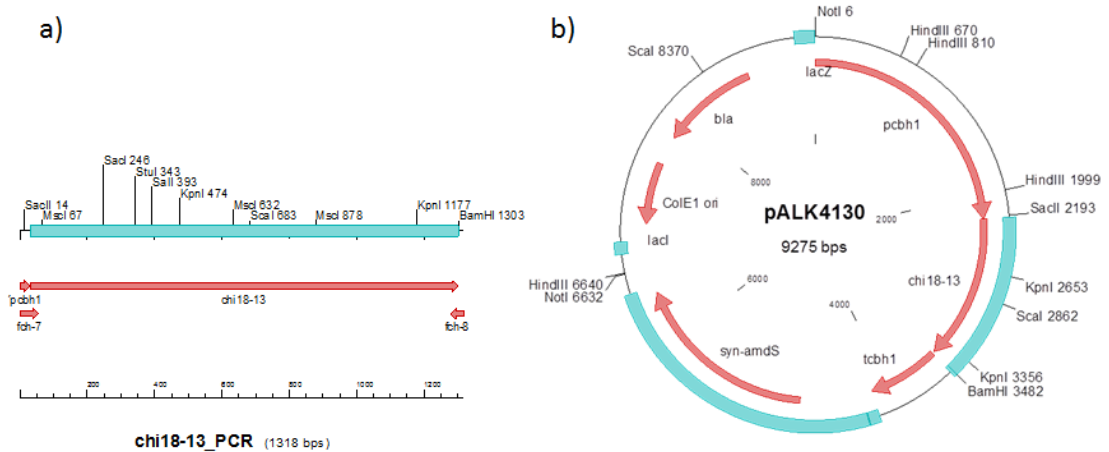
Reaktiot tehtiin Q5-reaktiopuskurissa (New England Biolabs, US), joka sisälsi 200 µM dNTP-seosta (Thermo Scientific, EU) ja Q5 High-GC Echancer -liuosta (New England Biolabs, US). Reaktioiden kokonaistilavuus oli 100 µl. Reaktioiden jälkeen PCR-tuotteet ajettiin agaroosigeeliin ja saadut palat eristettiin geelistä. PCR-tuotteiden koot löytyvät taulukosta 2.

Taulukko 2. PCR-reaktiossa käytettyjen alukkeiden sekvenssit ja PCR-tuotteiden koot (bp).

Kitinaasi-geeni	Tuotto-kasetti	PCR-tuotteen koko (bp)	Aluke	Sekvenssi
Chi18-6	pALK4127	1660	fch-1	ACCCAATAGTCAACCGCGGACTGCGCATCATGTTCA-GACTCCTTTGCATTGGTTTGC
			fch-2	GTTACTGCAGGGATCCTCACCACCTCGTCGCATTCC-GAATG
Chi18-11	pALK4128	1418	fch-3	ACCCAATAGTCAACCGCGGACTGCGCATCATGCA-GATCACATATCTTGCGGCGGC
			fch-4	GTTACTGCAGGGATCCT-CAGTCGTCCTGCTTCTGCTCC
Chi18-12	pALK4129	1227	fch-5	ACCCAATAGTCAACCGCGGACTGCGCAT-CATGCCTTCCTTGACTGCTCTCGC
			fch-6	GTTACTGCAGGGATCCTTATTTAGAGCGTCTGA-CAACCTGGTC
Chi18-13	pALK4130	1318	fch-7	ACCCAATAGTCAACCGCGGACTGCGCAT-CATGTTCTTCAGCAAAGCACTGGCTGC
			fch-8	GTTACTGCAGGGATCCTTAGTTGGAGCA-GACGCCGTTCTTG
Chi18-15	pALK4131	1077	fch-9	ACCCAATAGTCAACCGCGGACTGCGCATCATGA-CACGTCTTCTCGATGCAAGCTTTG
			fch-10	GTTACTGCAGGGATCCTTAGATCCTGCCGTT-CAAGTTGTCACC
Chi18-17	pALK4132	1388	fch-11	ACCCAATAGTCAACCGCGGACTGCGCAT-CATGCCCTCCATCTCTTCTTTCACTTC
			fch-12	GTTACTGCAGGGATCCTTACTGACATGAAGACCAC-CACTCCG

4.2.2 Palojen ligointi tuottovektoriin ja *E. coli* -transformaatio

PCR-palat liitettiin valmiiseen tuottovektoriin käyttäen In-Fusion HD Cloning -kittiä (Clontech, US). In-Fusion Cloning on tehokas ligaatiomenetelmä, joka perustuu lineaarisen kloonausvektorin ja insertin alukkeiden päihin suunniteltujen vastakkaisten sekvenssialueiden entsyymaattiseen kiinnittämiseen (28). PCR-palat liitettiin vektoriplasmiin SacII- ja BamHI-leikkauskohtien välille. Kuvassa 4 on esitettynä geenin Chi18-3 sisältävä PCR-pala ja valmis tuottoplasmi, jossa PCR-pala on liitetty vektoriplasmiin.



Kuva 4. a) Geenin Chi18-13 sisältävä PCR-pala. b) Valmis tuottoplasmidi. PCR-palan 5'-päässä on *cbh1*-promoottorialueen loppuosan sekvenssiä ja 3'-päässä sekvenssiä, joilla pala liitetään vektoriplasmidissa olevaan *cbh1*-promoottoriin (tarkka liitos) ja linkkerisekvenssin (*Bam*HI) kautta *cbh1*-terminaattoriin.

Vektoriplasmidi digestoititiin ensin *Sac*II-entsyymillä, jonka jälkeen plasmidin lineaarisuus tarkistettiin agarosigeelijolla. Ennen seuraavaa digestointia *Bam*HI-entsyymillä vektorille tehtiin puskurin vaihto. Digestoitu DNA puhdistettiin reaktioseoksesta pylväs-puhdistuksella ja sen jälkeen digestoititiin *Bam*HI:lle sopivassa restriktiopuskurissa. *Bam*HI-käsittelyn jälkeen koko näyte ajettiin agarosigeelille, josta eristettiin 7,9 kb:n DNA-fragmentti. Vektoripala puhdistettiin geelijonon kautta, jotta päästiin eroon siitä digestissa irronneesta 55 bp:n palasta. Lopuksi vektorista mitattiin sen pitoisuus ja eristetyin palan koko varmistettiin agarosigeelijolla.

Ligaatioseoksessa käytettiin 100 ng vektori-DNA:ta ja 100 ng insertti-DNA:ta. Tämän jälkeen seosta transformoitiin *E. coli* -soluihin heat-shock transformaatiolla. Transformaatioissa DNA ja solut sekoitettiin ja niitä inkuboitiin jäällä 30 min, jonka jälkeen soluille annettiin 45 sekunnin lämpöshokki 42 °C vesihauteessa, putket jäähdytettiin jäällä ja niihin lisättiin SOC-liuosta. Soluja kasvatettiin (1 h, 37 °C, 250 rpm), jonka jälkeen transformaatioseosta levitettiin 50 µl yhdelle LB + ampicilliini -maljalle ja loput toiselle.

4.2.3 Plasmidieristykset, liitosalueiden ja geenien tarkistus

Plasmidien tarkistamiseksi *E. coli* -transformaatiomaljoilta poimittiin jokaisesta transformaatiosta kolme erillispesäkettä. Pesäkkeet ympättiin kasvamaan 2 ml:aan LB + ampicilliini -alustaa ja niitä tehtiin agar-maljalle puhtasviljelmä.

Bakteerinestekasvatuksesta kerättiin solut sentrifugoimalla 5 minuutin ajan 8000 rpm:n kierrosnopeudella (Rotanta 460, Hettich). Tämän jälkeen soluista tehtiin mini-mitan plasmidieristys ja plasmidinäytteistä mitattiin DNA-pitoisuus.

Plasmideille tehtiin digestiot *Hind*III-entsyymillä sekä usealla muulla restriktioentsyymillä (*Not*I, *Bam*HI, *Pst*I, *Xho*I, *Sal*I, *Kpn*I, *Sca*I ja *Eco*RI) ja tarkistettiin, että saatujen DNA-palojen koot vastasivat tuottoplasmidin sekvenssin perusteella laskettuja restriktiopalojen kokoja. Liitteessä 1 näkyy restriktiopalojen odotetut koot. Digestioseosten tilavuus oli 20 µl ja DNA:ta digestioihin käytettiin noin 200 ng.

Plasmidien valmistamiseksi tuottokasettien eristämistä varten valittujen *E. coli* -kloonien puhdasviljelmämaljoilta poimittiin yksi erillispesäke jokaisesta transformaatiosta ja ympättiin se kasvamaan 50 ml:aan nestealustaa. Viljelmän soluista tehtiin mini-mitan plasmidieristys.

Vektorin ja insertin välisten liitosalueiden ja kitinaasigeenien sekvenssit tarkistettiin. Sekvensointireaktiot tehtiin PCR:llä. Reaktiossa käytettiin BigDye Sequencing -puskuria ja Terminator Ready Reaction Mixiä (molemmat Applied Biosystemsiltä, US). Reaktioissa käytetyt alukkeet suunniteltiin siten, että niillä saadut sekvenssit kattavat koko geenin alueen. Tarkemmat tiedot alukkeista löytyvät liitteestä 2. Lisäksi käytettiin *cbh1*-promoottorin ja -terminaattorin alueille sijoittuvia alukkeita liitosalueiden sekvenssien tarkistusta varten.

Menetelmässä käytettiin seuraavaa PCR-reaktiota:

1. 96°C 1 min
2. 96°C 10 s
3. 60 °C 4 min
4. Toistetaan 24 kertaa syklit 2 - 3
5. 4 °C

PCR-reaktion jälkeen sekvensointinäytteet puhdistettiin liittymättömistä nukleotideista etanolipesuilla. Näytteet resuspensoitiin 20 µl:aan HiDi-formamidia (Applied Biosystems, UK) ja ajettiin kapillaarielektroforeesilla ABI PRISM 310 Genetic Analyzer -laitteella (Applied Biosystems) käyttäen injektioaikana 20 s ja ajoaikana 45 min.

Reaktioista saadut geenisekvenssit analysoitiin Sequencher 5.3 -ohjelmalla (Gene Codes Corp., US). Clone Manager 9 -ohjelmiston (Sci-Ed Software, US) vertailutoiminnolla tarkistettiin, ettei PCR-reaktiossa ole tapahtunut mutaatioita vertaamalla saatuja sekvenssejä julkisesta *T. reesei* -genomista otettuihin sekvensseihin.

4.2.4 Tuottokasettien irrottaminen ja puhdistus geeliltä

Plasmideista irrotettiin tuottokasetit *NotI*-digestiolla *Trichoderma reesei* -transformaatiota varten. Eristys tehtiin digestiolla, jossa käytettiin 50 µg DNA:ta. Näytteitä digestoitiin 37 °C:ssa 3 tuntia. Oikean kokoiset fragmentit eristettiin agarosigeeliltä. Fragmenttien koot löytyvät merkattuina liitteestä 1. Näytteistä mitattiin pitoisuus, jonka jälkeen näytteet olivat valmiit transformaatiota varten.

4.3 *Trichoderma reesei* -transformaatio ja transformanttien käsittely

Transformaatio tehtiin *Trichoderma*-tuottokantaan käyttäen protoplastitransformaatiomenetelmää (26, s. 5151 - 522; 27, s. 223 - 228). Homeesta valmistetut protoplastit suspendoitiin 1,0 M sorbitoli, 0,05 M CaCl₂, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5 -liuokseen. 20 µl DNA:ta transformoitiin 200 µl:aan lämpökäsiteltyjä protoplasteja. Transformaatiossa käytettiin 60 % PEG 4000, 0,05 M CaCl₂, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5 -liuosta. Transformaatioseos sekoitettiin 100 ml:aan sulaa 48 °C:sta transformaatioalustaa ja maljattiin kymmenelle transformaatiomaljalle. (27, s. 223 - 228).

T. reesei -transformanttien puhdistus tapahtui asetamidiselektiolla. Menetelmän tarkoituksena on puhdistaa transformantit niin, että saadaan kanta, joka sisältää ainoastaan yhdenlaista genomia. Puhdistus tapahtui alla kuvatulla tavalla.

Transformaatiomaljalle kasvaneista pesäkkeistä valittiin hyvin kasvaneita erillispesäkkeitä, joista siirrostettiin itiöitä kasvamaan selektiomaljalle. Selektiomaljoilta suspensoitiin homekasvustoa (myseeliä ja itiöitä) 0,9 % NaCl - 0,01 % Tween 80 -liuokseen.

Suspensio suodatettiin steriilin pumpulin läpi, jotta saatiin poistettua myseelifragmentit. Tämän jälkeen itiösuspensio laimennettiin edellä mainittuun NaCl – Tween-liuoksella ja sitä levitettiin hajotusmaljalle.

Hajotusmaljoilta poimittiin yksi erillispesäke jokaisesta transformantista ja siirrostettiin se kolmelle PD-vinopinnalle. Yksi vinopinnoista käytettiin nesteviljelmän ympäykseen. Loput vinopinnat käytetään myöhemmin esimerkiksi kannan talletukseen ja fermentointikasvatuksen ympäähämiseen.

4.4 Analyysit

Kaikki analyysit tehtiin nesteviljelmäkasvatuksen kasvuliuoksista, joista homemyseeli oli poistettu sentrifugoimalla (4000 rpm, 10 min) kasvatuksen jälkeen. Kasvuliuos kaadettiin puhtaaseen putkeen, josta se jaettiin pienempiin eriin analyysijä varten. Myös myseeli otettiin talteen mahdollisesti myöhemmin tehtäviä genomien analysointeja varten.

4.4.1 SDS-PAGE

T. reesei -kantojen kasvualustaansa erittämät proteiinit eroteltiin 12 % SDS-polyakryyliamidigeleillä (SDS-PAGE; Bio-Rad, US). Proteiinien erottelu geelillä perustuu denaturoitujen proteiinien elektroforeettiseen liikkuvuuteen, johon vaikuttavat polypeptidin molekyylipaino, proteiinin laskostuminen, translaation jälkeiset muokkaukset sekä muut tekijät (29). SDS-PAGE -geeliltä voidaan arvioida, kuinka paljon proteiinia näyte sisältää, onko kanta tuottanut kasvualustaansa tuottokasetin koodaamaa rekombinantientsyymiä ja tuotetun entsyymin suhteellinen osuus eritetyistä entsyymeistä. SDS-PAGE-geelit värjättiin Biosafe Coomassie G-250 stain-värillä (Bio-Rad, US).

4.4.2 Proteiininääritys

Kasvuliuoksista tehtiin proteiininääritys Bio-Rad-menetelmällä (Bradford, 1976). Bio-Rad-proteiininääritysmenetelmässä mitatun värin absorbanssi on verrannollinen proteiinkonsentraatioon, ja menetelmä soveltuu liukoisten proteiinien konsentraation määrittämiseen. (30.) Näytteessä olevat emäksiset aminohapot, arginiini, lysiini ja histidiini, reagoivat värireagenssin kanssa ja muuttavat absorptiomaksimin (31). Reaktiot tehtiin

mikrokyveteissä ja tulokset analysoitiin nesteenkäsittelyrobotilla (Freedom Evo/200, Tecan) (30).

4.4.3 Entsyymiaktiivisuuksien analysointi

Työssä kokeiltiin kahta erilaista markkinoilta löytyvää kitinaasiaktiivisuuden mittaamiseen soveltuvaa kittiä. Kittien avulla pyrittiin karakterisoimaan tuotettujen kitinaasien aktiivisuutta ja niiden aktiivisuudelle optimaaliset olosuhteet, kuten lämpötila ja pH.

Chitinase Assay Kit (Sigma-Aldrich, US) sisältää kolme pienikokoista kitinaasisubstraattia, joilla voidaan tutkia sekä eksokitinaasi- että endokitinaasiaktiivisuuksia (32). Substraatteihin on liitetty *p*-nitrofenoliryhmä (4-nitrofenoli). Substraatin hydrolyysi vapauttaa *p*-nitrofenolin, joka ionisoituu reaktion lopettamisessa käytettävässä korkeassa pH:ssa ja voidaan sen jälkeen mitata aallonpituudella 405 nm. Kitti sisältää seuraavat substraatit: 4-nitrofenyyli-N,N'-diasetyyli- β -D-kitobiosidi, 4-nitrofenyyli-N-asetyyli- β -D-glukosaminidi ja 4-nitrofenyyli- β -D-N,N',N''-triasetyylikitotrioosi. Kitin substraateista 4-nitrofenyyli-N,N'-diasetyyli- β -D-kitobiosidi soveltuu kitobiosidaasiaktiivisuuden mittaukseen ja 4-nitrofenyyli-N-asetyyli- β -D-glukosaminidi β -N-asetyyloglukosaminidaasiaktiivisuuden mittaukseen. 4-nitrofenyyli- β -D-N,N',N''-triasetyylikitotrioosi soveltuu endokitinaasiaktiivisuuden analysoimiseen.

Kitin substraatteja käyttämällä voidaan määrittää, minkä tyyppistä aktiivisuutta kitinaasilla on ja kuinka paljon sitä näytteissä on. Analyysissa kokeiltiin eri näytemääriä, jotta löydettäisiin aktiivisuuksien lineaarinen alue. Analyysi tehtiin kitin ohjeen mukaan 30 minuutin inkubointiajalla 37 °C:ssa. Substraatin 4-nitrofenyyli- β -D-N,N',N''-triasetyylikitotrioosi pitoisuus analyyseissä oli 0,2 mg/ml ja kahden muun substraatin pitoisuus oli 1 mg/ml.

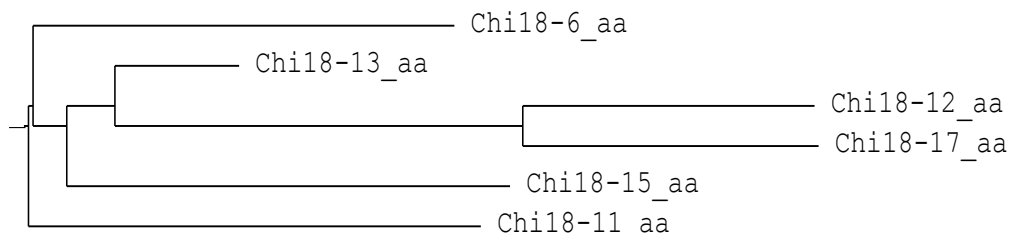
Chitozyme-tablettitesti (Megazyme, Irlanti) on tarkoitettu kitosaania pilkkovien entsyymien (kitosanaasien ja kitinaasien) aktiivisuuden analysointiin. Tabletit sisältävät puhdistettua kitosaania, joka on värjätty ja ristisidottu Azurinella (AZCL-kitosaani, "Azurine-Crosslinked Chitosan"). Tablettimenetelmä perustuu entsyymien aktiivisuuteen AZCL-Chitosan-substraattia vastaan. Substraatin hydrolysoituessa väriä sisältävät fragmentit irtoavat. Väri mitataan aallonpituudella 590 nm (33). Kitosaanitabletteja testattiin, koska monet kitinaasit pilkkovat myös kitosaania.

Kitosaanitabletteja käytettiin valitun kitinaasin pH-optimin ja lämpötilaoptimin selvittämiseksi. pH-optimia määritettiin väliltä 2 - 9 ja lämpötilaoptimia väliltä 30 - 80 °C. Lisäksi vertailtiin aktiivisuuseroja eri transformanttien kasvuliukoista.

Analyysit tehtiin Britton-Robinson-puskurissa, joka sisältää fosforihappoa, etikkahappoa ja boorihappoa. Kaikkien näiden aineiden konsentraatio oli 40 mM. Lisäksi analyysjä tehtiin 40 mM Na₂HPO₄ fosfaattipuskurissa.

5 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Ennen työn kokeellisen osuuden aloittamista Roal Oy:ssä oli valittu kitinaasit, joita haluttiin tuottaa *Trichoderma*:ssa. Tässä työssä kloonattiin ja siirrettiin *Trichoderma*:aan kuusi *T. reesei*:n kitinaasigeeniä: Chi18-6, Chi18-11, Chi18-12, Chi18-13, Chi18-15 ja Chi18-17. Valitut geenit ja niiden koodaamien proteiinien aminohapposekvenssien samankaltaisuudet on esitetty kuvassa 5. Chi18-12 ja Chi18-17 aminohapposekvenssien välinen identiteetti ("matching bases") oli 40 %. Geenin Chi18-13 ja esimerkiksi Chi18-6, Chi18-11 ja Chi18-12 väliset identiteetit olivat 17 %, 19 % ja 23 %. Valituista gee-neistä kolme kuuluu kitinaasiryhmään B (Chi18-12, Chi18-13, Chi18-17), kaksi kuuluu ryhmään A (Chi18-6, Chi18-11) ja yksi (Chi18-15) on luokittelematon.



Kuva 5. Työssä tuotettavaksi valitut kitinaasit ja niiden aminohapposekvenssien samankaltaisuus (SciEd9 Clone Manager, Multi-way Protein alignment, Scoring matrix: BLOSUM 62).

Työssä kloonattiin kuusi *T. reesei* -homeen kitinaasigeeniä ja rakennettiin niistä kasetit entsyymien tuottamiseksi. Valitut kitinaasigeenit ovat ryhmän A tai B edustajia ja kaikki ovat erittyviä (taulukko 1). Ryhmän C erittyviä kitinaasigeenejä ei valittu niiden suuren koon vuoksi. Tuottokasetit transformoitiin *T. reesei* -isäntäkantaan, noin 20 transformanttia jokaisesta transformaatiosta puhdistettiin ja kasvatettiin nesteviljelmissä. Transformanttien kasvuliukokset analysoitiin ja SDS-PAGE-geelien tuloksien perusteella

näistä kuudesta kitinaasista neljä tuottui *T. reesei* -homeessa. Tässä työssä tehtävää karakterisointia varten valittiin analysoitavaksi yksi hyvin tuottuneista kitinaaseista, Chi18-13. Tulokset ja tulosten tarkastelu -osiossa keskitytään kitinaasiin Chi18-13 ja sen tuottamiseen liittyvään työhön ja tuloksiin.

Chi18-13 luokitellaan kitinaasiryhmään B, ja se on luokituksensa perusteella endoki-tinaasi (taulukko 1). Chi18-13:n pituus on 1273 nukleotidiä ja se koodaa 401 amino-happoa (ID114979, http://genome.jgi.doe.gov/TrireRUTC30_1/TrireRUTC30_1.home.html). Se sisältää yhden intronin ja sen signaalsekvenssi on 19 aminohappoa (SignalP 3.0 Server, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>). Chi18-13:n laskennallinen massa ilman signaalsekvenssiä on 39,2 kDa (ExPASy Compute pI/Mw tool, http://web.expasy.org/compute_pi/) ja se sisältää kaksi todennäköistä ja viisi mahdollis-ta N-glykosylaatiokohtaa (NetNGlyc 1.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

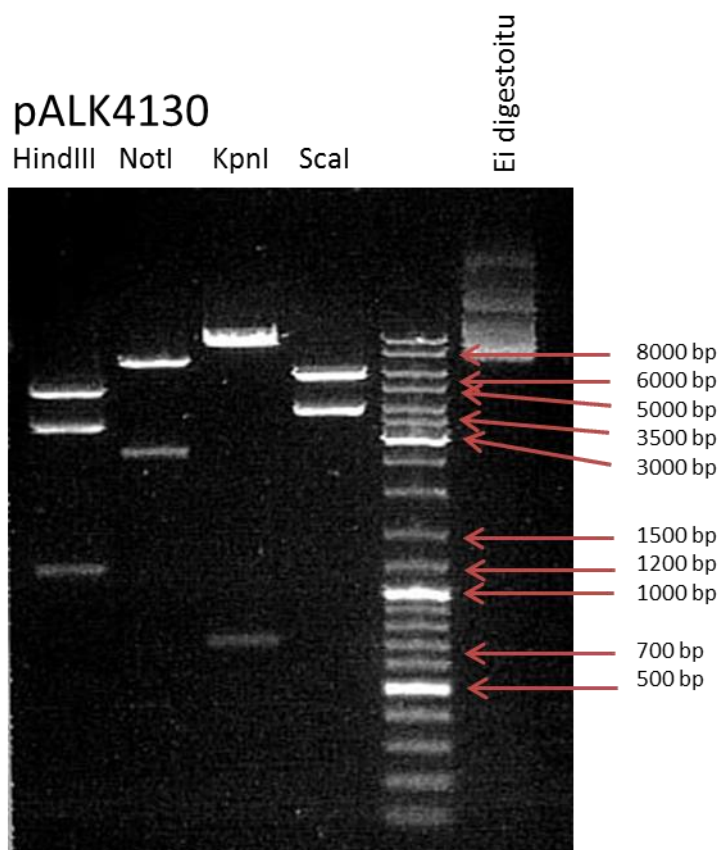
5.1 Kitinaasituottokasettien rakentaminen

Kitinaasituottokasettien rakentamisessa oli kolme työvaihetta: geenien syntetisointi PCR:llä, palojen liittäminen tuottovektoriin sekä liitosalueiden ja geenien tarkistus re-striktidigesteillä ja sekvensoimalla. Tuottokasetit irrotettiin rakennetusta tuottoplasmi-dista *T. reesei* -transformaatiota varten.

Kitinaasigeenin Chi18-13 syntetisointiin käytettiin alukkeita fch-7 ("5'-sense primer") ja fch-8 ("3'-antisense primer"), ja geenin ilmentämiseksi rakennettiin tuottoplasmidi pALK4130. Muista viidestä kloonatusta kitinaasigeenistä rakennettiin vastaavanlaiset tuottoplasmidit pALK4127 - pALK4129 ja pALK4131 - pALK4132.

PCR- ja sekvensointireaktioissa käytetyt alukkeet toimivat hyvin. Kaikista PCR-reaktioista saatiin odotetun kokoiset DNA-tuotteet ja sekvensointireaktiot olivat onnis-tuneita. Inserttipalojen sekvensseissä ei ollut eroja verrattuna *T. reesei* -genomin jul-kaistuihin geenisekvensseihin, joten voitiin todeta, että PCR-reaktioissa ei ollut tapah-tunut mutaatioita. Lisäksi restriktioentsyymeillä tehtyjen tarkistusdigestioiden tulokset osoittivat plasmidien kokonaisuudeltaan vastaavan suunniteltuja. Kuvassa 6 on esitetty Chi18-3:lle tehtyjen tarkistusdigestioiden tulokset agaroosigeelillä. Työssä edettiin tuot-

tokasettien irrottamiseen ja niiden transformaatioon tuottoisäntään. Tuottokasetit irrotettiin tuottoplasמידeista *NotI*-digestion avulla.



Kuva 6. Chi18-3:lle tehdyt tarkistusdigestiot. Digestiot tehtiin neljällä eri entsyymillä: *HindIII* (140 + 1189 + 3305 + 4641 bp), *NotI* (2648 + 6626 bp), *KpnI* (703 + 8572 bp) ja *Scal* (3767 + 6608 bp).

5.2 *Trichoderma reesei* -transformaatio ja transformanttien käsittely

Tuottoplasמידeista irrotetut tuottokasetit puhdistettiin ja transformoitiin *T. reesei* -isäntäkantaan. Transformaatioista eri kitinaasien tuottokaseteilla pesäkkeitä saatiin neljästäkymmenestä 140:een. Chi18-13 kitinaasin pALK4130-tuottokasetin transformaatiosta pesäkkeitä kasvoi noin 110.

Transformanteja poimittiin puhdistettavaksi kaikista transformaatioista noin 20 kappaletta. Puhdistuksen eri vaiheissa muutamia transformanteja kuitenkin jäi pois, sillä kaikki eivät kasvaneet kunnolla selektiomaljoilla. Tämä saattoi johtua siitä, että ne olivat epästabiileja kantoja, joista puhdistuksen aikana hävisi selektiomerkkigeeni tai että ne

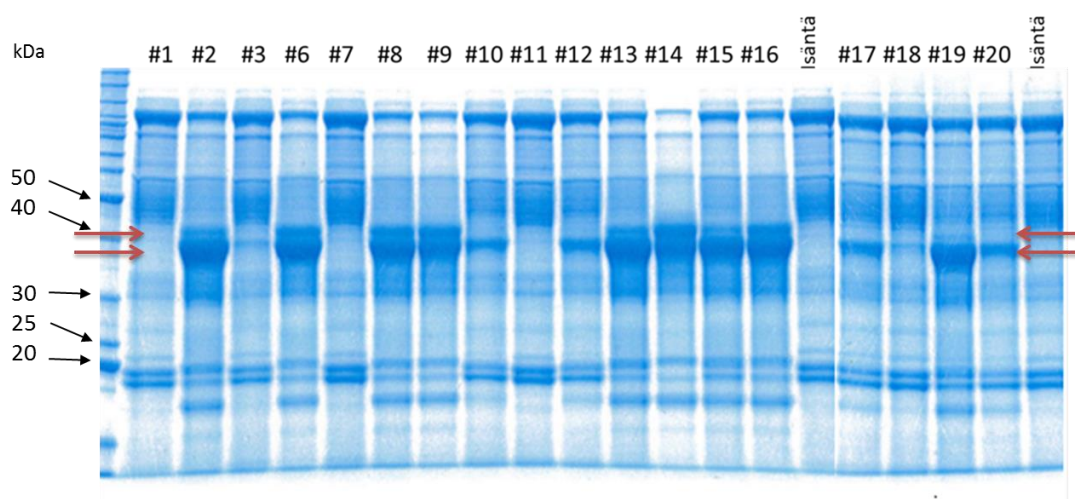
eivät olleet oikeita, kitinaasin tuottogeeniä sisältäviä pesäkkeitä vaan taustakasvua transformaatiomaljoilla. *T. reesei* pALK4130 -transformanteista saatiin puhdistettua 18.

Transformantit ja isäntäkanta kasvatettiin liuosviljelmissä. Kasvatuksen jälkeen homeyseeleli poistettiin sentrifugoimalla ja kasvuliuokset kerättiin analyysijä varten.

5.3 Analyysit

5.3.1 Kasvuliuksien analysointi

Kasvuliuksista analysoitiin homeen kasvua, sen tuottamien proteiinien ja rekombinanttikitinaasin määrää ja tuotetun kitinaasin ominaisuuksia. SDS-PAGE-geelin perusteella pALK4130-transformantit tuottivat isäntäkantaansa verrattuna runsaasti noin 39 kDa:n suuruista proteiinia (kuva 7). Kyseisen proteiinin massa vastaa Chi18-13:n laskennallista massaa 39,2 kDa, joten voitiin olettaa, että *T. reesei* tuotti hyvin Chi18-13-kitinaasia. Pääproteiinin lisäksi kyseiset transformantit tuottivat jonkin verran noin 43 kDa:n kokoista proteiinia. Chi18-13 sisältää 2 todennäköistä *N*-glykosylaatiokohtaa. Korkeamman molekyyli­massan proteiini on todennäköisimmin sokeroitu muoto Chi18-13:sta. Asia todennetaan myöhemmin käsittelemällä näytteitä *N*-glykaanit irrottavilla entsyymeillä (EndoH_f ja PNGaseF).



Kuva 7. *T. reesei* pALK4130-transformanttien kasvuliuksien SDS-PAGE-analyysitulokset. Geelillä näkyy noin 39 kDa:n Chi18-13 (alempi nuoli) ja noin 43 kDa:n sokeroitu muoto Chi18-13:sta (ylempi nuoli).

SDS-PAGE:n perusteella pystyttiin päättämään, mitkä transformantit olivat tuottaneet kitinaasia ja kuinka paljon proteiinia oli tuottunut. Transformantteja on helppo vertailla geelillä isäntäkantaan. Geelin perusteella yhdeksän transformanttia on tuottanut runsaasti rekombinanttiproteiinia (transformantit 2, 6, 8, 9, 13, 14, 15, 16 ja 19), kuusi hie-
man (transformantit 3, 10, 12, 17, 18 ja 20) ja kolme on isännän kaltaisia eli eivät ole todellisia transformantteja (transformantit 1, 7 ja 11).

Kaikilla kuudella tuottuneella kitinaasilla oikeiden transformanttien prosenttiosuus on SDS-PAGE:n perusteella noin 60 - 100 %. Tämän tiedon perusteella voidaan arvioida, kuinka paljon transformantteja tulee poimia, jotta saadaan analysoitavaksi riittävästi kitinaasia tuottavia transformantteja.

Bio-Rad-menetelmällä analysoidaan totaaliproteiinin määrää kasvuliuksessa. Bio-Rad-menetelmällä saaduissa kokonaisproteiinien pitoisuuksissa oli eroja transformanttien välillä. Tulokset olivat kuitenkin yhteneviä SDS-PAGE-tuloksien kanssa: korkeimmat proteiinipitoisuudet (mg/ml) saatiin niiden transformanttien kasvusupeista, jotka SDS-PAGE:n mukaan olivat tuottaneet korkean määrän rekombinanttikitinaasia (taulukko 2).

Proteiinimäärän analysoimisen lisäksi kasvuliuksista mitattiin pH nesteviljelmäkasvatuksen jälkeen. pH-mittauksen tuloksissa ei näy poikkeavuuksia ja tulokset ovat transformanttien ja isännän välillä samanlaiset (taulukko 2). Suurin ero isännän ja transformantin välillä on ainoastaan 0,12 pH-yksikköä (transformantti 3). Kasvuliuksista heti nesteviljelmäkasvatuksen jälkeen tehty pH-arvon mittaaminen tehdään mahdollisten kasvuerojen selvittämiseksi. Joidenkin rekombinanttiproteiinien tuotto vaikuttaa homeen kasvua heikentävästi. Jos transformanttien sekä isännän kasvuliusten pH on samanlainen, voidaan olettaa, ettei kasvatuksessa ole tapahtunut mitään poikkeavaa ja että tuotettu proteiini ei ole vaikuttanut kannan kasvuominaisuuksiin epäedullisesti. Chi-13-kitinaasia tuottaneet transformantit olivat pH-tulosten perusteella kasvaneet isäntäkantaa vastaavalla tavalla. Tulosten yhteenveto on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 3. Tulokset kasvuliuoksista määritetyistä pH-arvoista ja eritettyjen proteiinien määristä. SDS-PAGE:n tulokset merkitty +/- -merkeillä. + -merkkien lukumäärä kuvaa Chi18-13-proteiinin suhteellista määrää ja - -merkki tarkoittaa, ettei geelillä näy rekombinanttiproteiinia.

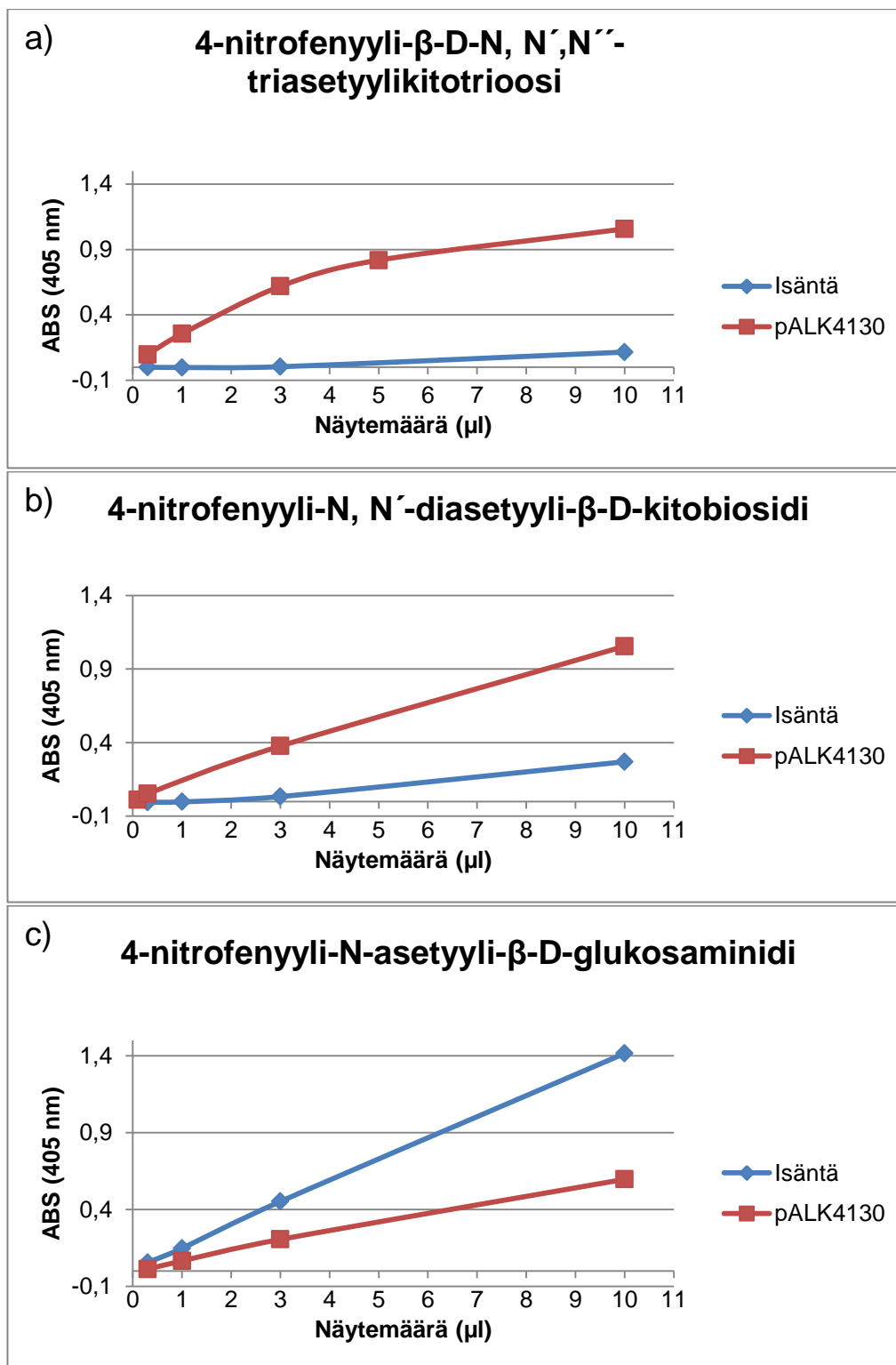
pALK4130-transformantin koodi	pH	Totaaliproteiinin määrä (mg/ml)	SDS-PAGE
1	4,25	2,54	-
2	4,3	4,4	+++++
3	4,31	2,31	+
6	4,26	3,91	++++
7	4,28	2,87	-
8	4,23	3,57	++++
9	4,2	3,25	+++
10	4,19	2,58	++
11	4,25	2,76	-
12	4,19	2,43	++
13	4,24	3,7	++++
14	4,17	3,47	+++
15	4,22	3,95	+++
16	4,17	4,00	++++
17	4,18	2,93	++
18	4,17	2,51	+
19	4,3	4,07	+++
20	4,15	2,39	++
Isäntä	4,19	2,84	-

5.3.2 Kitinaasin ominaisuuksien määrittäminen

Kitinaasiaktiivisuuden määrittämistä kasvuliuoksista testattiin käyttäen lyhyitä kiitiinisubstraatteja (Chitinase Assay Kit) ja kitosaanitabletteja (Megazyme). Näytteenä analyyseissä käytettiin pALK4130-transformantin #2 kasvuliuosta. Tämä transformantti tuotti SDS-PAGE:n perusteella paljon haluttua proteiinia ja valittiin sen vuoksi analyysiin näytteeksi. Analyyseissä tehtiin myös näytenolla, joka sisälsi entsyymilaimennoksen, mutta reaktion pysäyttävä liuos laitettiin näytteeseen ennen inkubointia, joten entsyymireaktiota ei tapahdu. Kaikista näytteiden absorbanssituloksista vähennettiin näytenollan tulos.

Kontrollina testeissä käytettiin *T. reesei* -transformaatioisännän kasvuliuosta. *T. reesei* tuottaa useita kitinaaseja (taulukko 1), joten isäntäkannan kasvuliuokseen oletettiin mahdollisesti erittyneen pieniä määriä kitinaasia, kitinaaseja ja myös mahdollisesti synergistisesti toimivia kitinaaseja, joka tai jotka antavat analyyseissä aktiivisuutta.

Chi18-13:n spesifisyyden määritykset tehtiin käyttäen lyhyitä kitiinisubstraatteja kitin ohjeiden mukaisessa pH:ssa 7,4 ja lämpötilassa 37 °C. Kitin kolmesta substraatista Chi18-13 oli aktiivinen 4-nitrofenyyli- β -D-N,N',N''-triasetyylikitotriosoosille ja 4-nitrofenyyli-N,N'-diasetyyli- β -D-kitobiosidille, mutta ei 4-nitrofenyyli-N-asetyyli- β -D-glukosaminidille (kuva 8). Kirjallisuuslähteiden mukaan Chi18-13 on endokitinaasi, joten sen oletettiin tämän perusteella olevan aktiivinen 4-Nitrofenyyli- β -D-N,N',N''-triasetyylikitotriosoosille.



Kuva 8. Chi18-3-kitinaasia sisältävän näytteen (pALK4130) ja isäntäkannan entsyymiaktiivisuudet 4-nitrofenyyli- β -D-N,N',N''-triasetyylikitotrioosille (a), 4-nitrofenyyli-N, N'-diasetyyli- β -D-kitobiosidille (b) ja 4-nitrofenyyli-N-asetyyli- β -D-glukosaminidille (c). Analyysissä käytetty pH oli 7,4 ja lämpötila 37 °C.

Tuloksien perusteella (kuva 8c) Chi18-13-kitinaasia tuottavan transformantin kasvuliuoksessa ei ollut selvää aktiivisuutta 4-nitrofenyyli-N-asetyyli- β -D-glucosaminidille (absorbanssi 0,597). Vaikka reaktiosta saatu absorbanssiarvo kasvoi näytemäärän kasvaessa, oli transformantin kasvuliuoksesta mitattu aktiivisuus silti selvästi pienempi kuin isäntäkannan kasvuliuoksesta. Kitinaasigeenin ilmentyminen ja/tai Chi18-13-kitinaasin tuotto näytti vaikuttavan alentavasti isännän tuottamien kitinaasien suhteelliseen määrään tai määriin ja sitä kautta mitattuun aktiivisuuteen.

Chi18-13:n aktiivisuus (absorbanssi 1,058) oli suhteellisesti korkein 4-nitrofenyyli- β -D-N,N',N''-triasetyylikitotrioosi-substraatile (kuva 8a), joka on endokitinaasiaktiivisuutta mittaava substraatti. 4-nitrofenyyli-N,N'-diasetyyli- β -D-kitobiosidi-substraatin aktiivisuus oli melkein sama (absorbanssi 1,055), mutta siinä myös isännän aktiivisuus oli korkeampi kuin 4-nitrofenyyli- β -D-N,N',N''-triasetyylikitotrioosi-substraatin (kuva 8b).

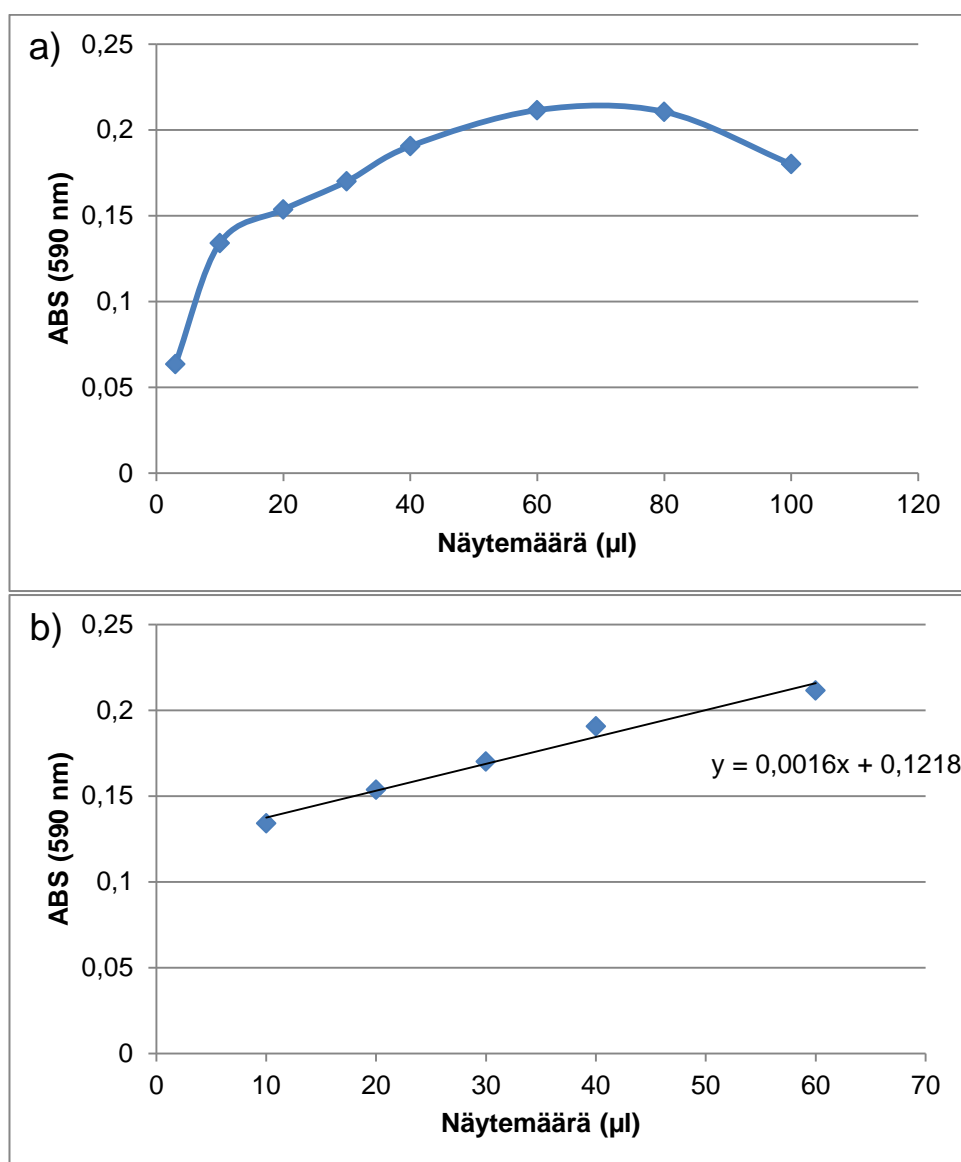
Analyysissä käytettiin näytemääriä väliltä 0,1 - 10 μ l. Näytteenä käytettiin 1:20 - laimennettua kasvuliuosta. Näytemäärän kasvaessa yli 3 μ l:n aktiivisuus ei enää nousut lineaarisesti 4-nitrofenyyli- β -D-N,N',N''-triasetyylikitotrioosisubstraatile (kuva 8a). Mahdollisesti 4-nitrofenyyli- β -D-N,N',N''-triasetyylikitotrioosin määrä oli rajoittava tekijä, koska tämän substraatin konsentraatio reaktiossa oli substraatin kalleuden takia 0,2 mg/ml kun taas kahden muun substraatin määrä oli 1 mg/ml. Kahta muuta substraattia vastaan aktiivisuuden lineaarinen alue jatkui 10 μ l:aan asti.

Tulosten perusteella Chi18-13:lla on aktiivisuutta 4-nitrofenyyli-N,N'-diasetyyli- β -D-kitobiosidi ja 4-nitrofenyyli- β -D-N,N',N''-triasetyylikitotrioosi-substraateille. Tulos vahvistaa, että Chi18-13 on endokitinaasi. Näiden tulosten perusteella sillä on myös ekso-kitinaasiaktiivisuutta.

Chi18-13-kitinaasin mahdollinen aktiivisuus kitosaanille testattiin Chitozyme-tablettitestillä. Kitiini ja kitosaani eroavat toisistaan D-glukosamininiyksikköjen (GlcN) asetyyliryhmien lukumääriltään. Polymeerit, jotka sisältävät enemmän kuin 70 % asetyloituneita GlcNAc-ryhmiä, ovat kitiinejä ja alle 30 % sisältävät ovat kitosaaneja. Kitinaasit ja kitosanaasit kuuluvat eri glycoside hydrolyse-perheisiin ja luokitellaan sen perusteella, miten ne pilkkovat kitiiniä ja kitosaania (34, s. 831 - 838).

Alustavien testitulosten perusteella käytettiin kasvuliuoksesta näytemääriä 3 - 100 µl. Tulosten perusteella (kuva 9a) Chi18-13:lla oli aktiivisuutta kitosaanille. Isäntäkannan kasvuliuos ei antanut aktiivisuutta kitosaanille (absorbanssiarvo oli -0,0015), mikä vahvistaa Chi18-13 aktiivisuuden kitosaanille.

Lineaarinen alue kasvuliuoksessa olevalle Chi18-13:lle oli 10 - 60 µl. Tulos varmistettiin piirtämällä toinen kuvaaja, jossa käytettiin ainoastaan oletetulta lineaariselta alueelta saatuja arvoja (kuva 9b).

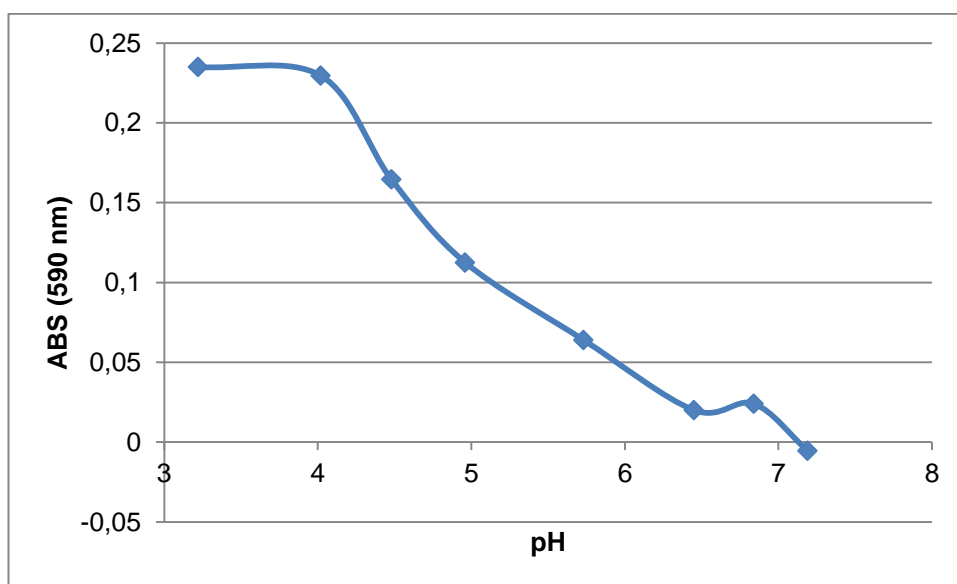


Kuva 9. Chi18-13-kiitinaasin aktiivisuus kitosaanille. Analyysi tehtiin Chitozyme-tablettitestillä Britton-Robinson-puskurissa pH:ssa 4,5, lämpötilassa 40 °C 10 min:n reaktioajalla. (a) Tulokset näytemäärillä 1 - 100 µl. (b) Tulokset näytemäärillä 10 - 60 µl.

Kuvaajaan piirrettiin trendiviiva, jonka perusteella todettiin, että valituilla näytemäärillä tulokset ovat lineaarisella suoralla (kuva 9b). Näytemääräksi Chi18-13:n pH- ja lämpötilaoptimien analysointiin valittiin lineaariselta alueelta 40 µl.

Chi18-13:n pH-optimin määrittämisessä käytettiin Britton-Robinson-puskuria. Kyseistä puskuria voidaan käyttää laajalla pH-alueella, mikä mahdollistaa pH-optimin määrittämisen käyttäen vain yhtä puskuriliuosta. Näytemäärä oli niin suuri, että se muutti tiettyihin pH-arvoihin säädetyn puskuriliuoksen pH-arvoa. Sen vuoksi ennen analyysia jokaisesta näytelaimennoksesta mitattiin todellinen reaktion pH ja tätä on käytetty kaikissa kuvaajissa (kuvat 10 - 12).

Ensimmäinen pH-optimin määrittäminen tehtiin pH-alueella 3 - 8, koska useimmin homeentsyymien toiminnan optimi on pH-alueella 4 - 6. Näytteen entsyymiaktiivisuus on korkeimmillaan pH:ssa 3 - 4 ja laskee pH:n 4 jälkeen tasaisesti. Näytteen aktiivisuus on matala jo pH:ssa 5 - 6, ja pH:n 7 jälkeen näytteessä ei ole mitattavaa aktiivisuutta. Tuloksista voidaan päätellä, että Chi18-13:n pH-optimi on happamalla alueella.

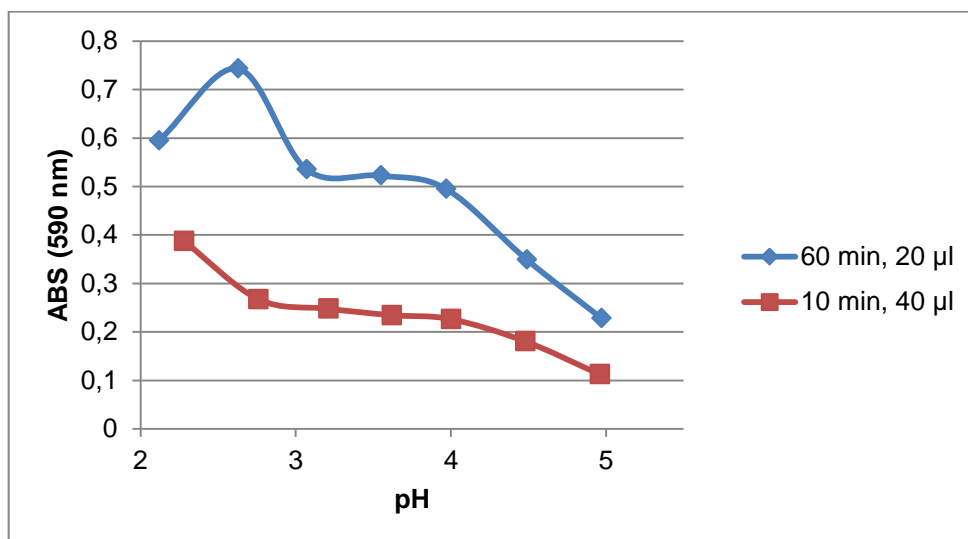


Kuva 10. Chi18-13:n pH-optimin määrittäminen pH-väliltä 3,2 - 7,2 (Britton-Robinson-puskuri, 40 °C, 10 min:n reaktioaika).

Tarkempaa analyysia varten määrittäminen toistettiin pH-alueella 2 - 5. Matalalla pH-alueella tehtyjen analyysien perusteella näytteen analyysissa antamat absorbanssi-arvot pH välillä 3 - 4 pysyivät suunnilleen samassa lukemassa (absorbanssi noin 0,3), mutta

alkoivat laskea pH-arvon 4 yläpuolella. (kuva 11, alempi käyrä). Absorbanssiarvot nousi selvästi, kun pH reaktiossa oli 2,5 ja pysyi korkeana myös reaktio-pH:ssa 2,0.

Analyysitulosten perusteella Chi18-13:n pH-optimi on hyvin hapan. Julkaistujen tulosten perusteella sieniperäiset kitinaasit ovat aktiivisia pH:ssa 4 - 7 (1, s. 345 - 360) ja *T. reesei* -entsyymien pH-optimit ovat yleensä pH-alueella 4 - 6. Tästä syystä saatu tulos eli Chi18-13:n suurin aktiivisuus hyvin matalassa pH:ssa oli epäilyksiä herättävä, ja siksi asiaa tutkittiin lisää. Suuri aktiivisuus hyvin happamalla alueella saattoi johtua siitä, että tablettimateriaali ei kestä käytettyjä happamia olosuhteita. Tablettitestin valmistajan suosittelema määrittämis-pH on 4,5. Todennäköisenä syynä odottamattoman korkealle absorbanssitulokselle pH:ssa 2,5 oletettiin kuitenkin olevan kitosaanin liukoisuus happoihin matalassa pH:ssa. Kitosaani ei ole liukoinen neutraalissa tai alkaalisissa liuoksissa. (35, s. 1028 - 1036.) Kitosaani (1 %) on liukoinen muun muassa 1 % etikkahappoon, jota Britton-Robinson-määrittämisspuskuri sisältää 0,23 %. Näin ollen pääteltiin, että määrittämisspukurissa oleva asetaatti saattaa liuottaa kitosaania ja aktiivisuuden nousu matalalla pH-alueella saattaa olla virheellinen tulos. Asian tarkistamiseksi pH-optimin analyysit toistettiin Britton-Robinson-spukurissa pH-välillä 2 - 5 käyttäen 10 ja 60 minuutin reaktioaikoja ja vaihtamalla määrittämisspukuri fosfaattispukuriksi (40 mM, 0,7 % Na_2HPO_4).

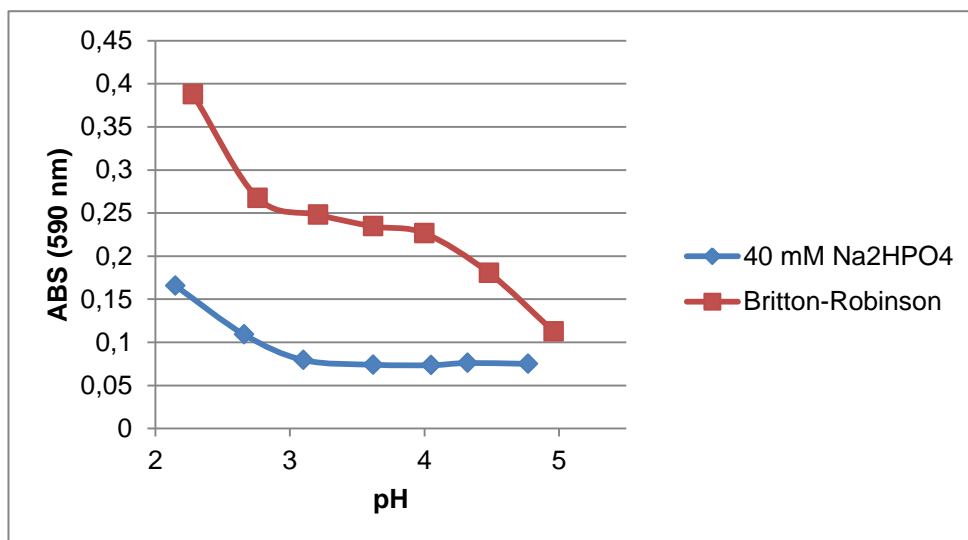


Kuva 11. Chi18-13:n pH-optimi analysointi (Britton-Robinson -puskuri, 40 °C, 10 min:n ja 60 min:n reaktioaika).

Käytettäessä 60 minuutin reaktioaikaa näytemäärä laskettiin 20 µl:ksi. Chi18-13:n aktiivisuus tasainen pH-välillä noin 3 - 4 sekä 10 että 60 min reaktioajoilla (kuva 11). Ab-

sorbanssi nousee 10 minuutin inkubaatioajalla pH:n laskiessa alle 3:n ja korkein absorbanssi saavutetaan pH:ssa 2,3. Käytettäessä 60 minuutin reaktioaikaa korkein aktiivisuus on pH:ssa 2,6, minkä jälkeen absorbanssiarvo laskee (pH 2,1). Tulosten perusteella ei voida varmasti päätellä, mistä korkea absorbanssin nousu pH-arvoa 3 matalammissa olosuhteissa johtuu. Näyttäisi kuitenkin todennäköiseltä, että Chi18-13:n optimi-pH-alue olisi noin 3 - 4 ja että matalamman pH-alueen korkeat absorbanssit mahdollisesti johtuisivat kitosaanin liukenemisesta ja sen vaikutuksesta entsyymin toimintaan. Entsyymi todennäköisesti toimii vielä pH:ssa noin 2,5 (mutta heikommin pH:ssa 2,1), mikä selittäisi osaltaan 60 minuutin reaktioajalla nähdyn korkean absorbanssin nousun. Tulosten perusteella ei kuitenkaan voida sulkea pois mahdollista entsyymin toiminnan optimia hyvin happamassa pH:ssa.

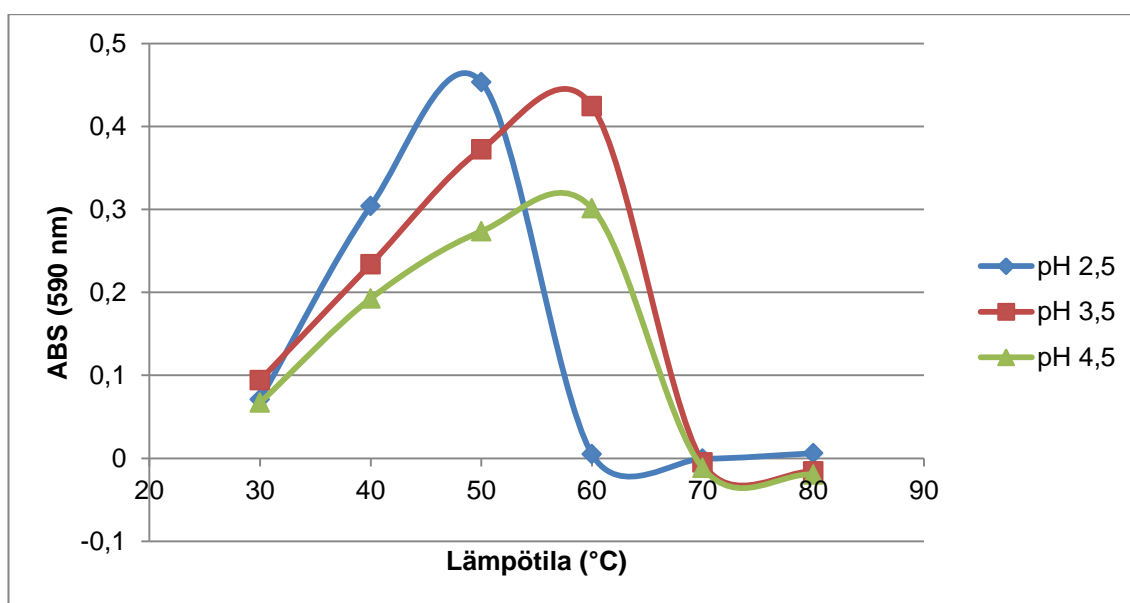
Olettamuksen varmistamiseksi pH-optimin analyysi toistettiin 40 mM Na_2HPO_4 -puskurissa pH-välillä 2 - 5. Tulosten perusteella molemmissa käytetyissä puskureissa kitosaani liukenee matalassa pH:ssa, mikä osaltaan vaikuttaa korkeisiin absorbanssituloksiin pH-alueella 2 - 2,5. Tulosten perusteella liukoisuus on parempi asetaattipuskuriin. Tehtyjen analyysien tulosten perusteella voidaan kuitenkin sanoa, että Chi18-13 toimii parhaiten happamassa pH:ssa ja sen pH-optimalue olisi noin 3 - 4. Päätelmää vahvistavat julkaistut tulokset, joiden mukaan kitosaani liukenee happoihin pH:ssa 0,6 - 2,8, mutta ei happoliuoksiin, joiden pH on 2,9 - 5,4 (35, s. 1028 - 1036).



Kuva 12. Chi18-13:n pH-optimin tarkistus Na_2HPO_4 -puskurissa (40 °C, 10 min:n reaktioaika). Kuvaan on liitetty kontrolliksi vastaavan Britton-Robinson-puskurissa tehdyn analyysin absorbanssitulokset.

Koska Chi18-13:n pH-ominaisuudet vaihtelivat riippuen käytetystä puskurista, eikä pH-optimista saatu täyttä varmuutta, lämpötilaoptimi määritettiin kolmessa eri pH:ssa, jotka sijoittuvat Chi18-13:n reaktioissa korkean absorbanssin antaneelle alueelle. Valitut puskuriliuosten pH:t olivat 2,5; 3,5 ja 4,5. (näytelaimennoksista mitatut pH:t 2,80; 3,62 ja 4,48). Lämpötilaoptimin määrittämiseksi reaktiot tehtiin 30, 40, 50, 60, 70 ja 80 °C:ssa käyttäen 10 minuutin reaktioaikaa.

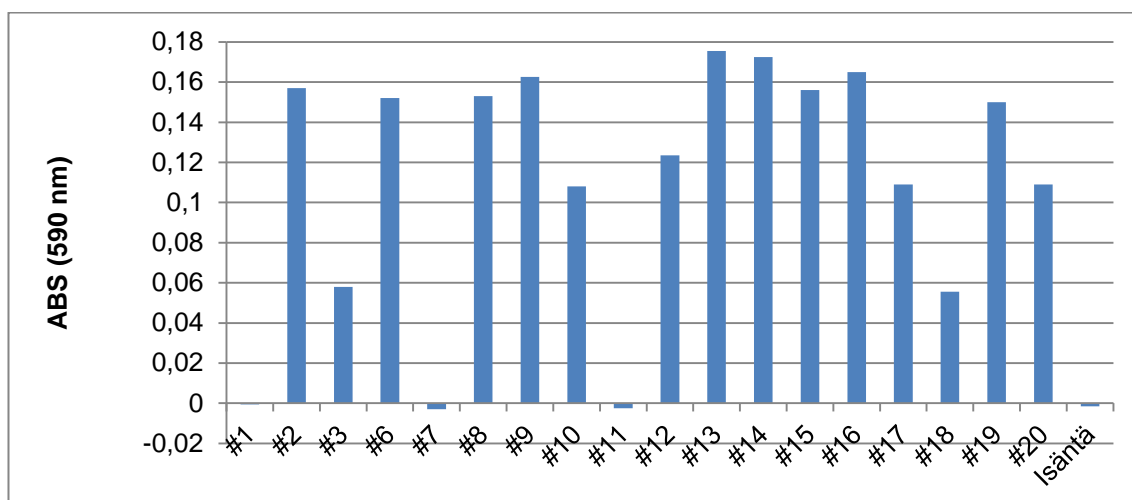
Chi18-13:n lämpötilaoptimi pH:ssa 2,8 oli 50 °C. Lämpötilaoptimi oli noin 10 °C korkeampi kuin reaktioissa, joissa pH oli 3,6 tai 4,5. Tulosten perusteella Chi18-13:n lämpötilaoptimi on noin 60 °C entsyymin toiminnalle sopivimmalla pH-alueella. Lämpökäyrien tulos myös osaltaan vahvistaa Chi18-13:n pH-optimalueen olevan välillä 3 - 4. Reaktio-pH:ssa 3,6 saavutetaan pH-arvoa 4,5 korkeammat absorbanssi-arvot lämpötilan optimaal alueella. pH:ssa 2,5 entsyymi ei pysty toimimaan enää 60 °C:ssa.



Kuva 13. Chi18-13:n lämpötilaoptimin määrittäminen välillä 30 - 80 °C. Reaktiot tehtiin Britton-Robinson -puskurissa 10 minuutin reaktioajalla.

Chi18-13:n ominaisuuksien alustavan karakterisoinnin jälkeen analysoitiin vielä transformanttisarjan kantojen kasvuliuostenvälisiä aktiivisuuseroja (Britton-Robinson-puskuri, pH 4,5; 40 °C, 10 min:n reaktioaika). Transformanteista yhdeksällä aktiivisuus kitosaanille oli korkea (0,150 - 0,175), kuudella hieman matalampi (0,108 - 0,124) ja kolmella ei ollut kitosaaniaktiivisuutta (kuva 14).

Transformantit, joiden kasvuliuoksista mitattu kitinaasin aktiivisuus oli korkea, todennäköisesti sisältävät kaksi tai useampia tuottokasettikopioita. Transformantit, joilla oli aktiivisuutta, mutta se oli matalampi, todennäköisesti sisältävät yhden tuottokasettikopion. Transformantit, joilla absorbanssiarvo oli negatiivinen, olivat isännän kaltaisia eli joko transformaatiomaljoilla kasvaneita taustapesäkkeitä tai epästabiileja transformantteja, jotka olivat puhdistuksen aikana menettäneet tuottokasetin genomistaan.



Kuva 14. pALK4130-transformanttien kitosaaniaktiivisuus (Britton-Robinson-puskuri, pH 4,5; 40 °C, 10 min:n reaktioaika, näytettä 40 µl).

Aktiivisuusanalyysissä saadut tulokset ovat verrannollisia SDS-PAGE-geeleiltä luettuihin tuloksiin (taulukko 2). Saaduista transformanteista noin 65 % oli tuottokasetin sisältäviä kantoja, joilla saatiin tuotettua kitinaasia Chi18-13. Näistä noin 45 % oli transformantteja, jotka sisältävät kaksi tai useamman tuottokasetin ja joiden tuottama entsyymiaktiivisuus on korkea.

6 Yhteenveto

Työn tavoitteena oli kloonata kitinaasigeenejä, tuottaa niiden koodittamia kitinaaseja *Trichoderma reesei* -homeessa ja karakterisoida yksi hyvin tuottuvista entsyymeistä. Roal Oy:n tarkoitus on jatkossa testata valitsemiaan kitinaaseja erilaisissa sovelluskokeissa.

Tässä työssä kitinaasigeenejä kloonattiin kuusi. Geenien koodaamien kitinaasien tuottamiseksi rakennettiin tuottokasetit, jotka transformoitiin *T. reesei* -isäntäkantaan. *T. reesei* tuotti kasvuliukseensa näistä kuudesta kitinaasista neljää. Hyvin tuottuneista kitinaaseista analysoitiin tässä työssä tarkemmin yhtä kitinaasia. Valittu kitinaasi oli Chi18-13. *T. reesei* tuotti Chi18-13-proteiinin kahtena eri muotona, joista toinen on todennäköisimmin sokeroitu muoto entsyymistä.

Saatujen tulosten perusteella Chi18-13 on aktiivisuudeltaan endokitinaasi, mutta sillä on aktiivisuutta myös eksokitinaasin tutkimiseen tarkoitetulle substraatille. Lyhyiden kitinisubstraattien lisäksi Chi18-13:lla on aktiivisuutta myös kitosaanille. Chi18-13 on happamassa pH:ssa toimiva entsyymi. Sen pH-optimi kitosaanisubstraatille on välillä 3 - 4. Chi18-13:n lämpötilaoptimi on optimi-pH:ssa noin 60 °C, joka on tyypillinen optimi home-entsyymeille. Chi18-13:n ja muiden tuotettujen kitinaasien karakterisointia tulee vielä jatkaa niiden optimiolosuhteiden, synergoiden ja parhaiten teolliseen käyttöön soveltuvan kitinaasin tai kitinaasiyhdistelmien löytämiseksi. Alustavien karakterisointien jälkeen valittuja kitinaaseja testataan sovelluskokeissa ja niitä tuottavia kantoja kasvatetaan isommissa mittakaavoissa lisäanalyysia varten.

Työn tavoitteena oli myös testata analyysimenetelmiä, joiden avulla kitinaasin tuottoa voitaisiin jatkossa analysoida Roal Oy:n T&K-laboratoriossa. Lyhyitä substraatteja sisältävällä Chitinase Assay -kitillä voidaan analysoida kitinaasien aktiivisuutta ja spesifisyyttä endo- ja eksokitinaaseille tarkoitetuille substraateille. Kitin avulla voidaan myös vertailla kaikkien tuotettujen kitinaasien aktiivisuuksia toisiinsa. Megazymen Chitozyme-tabletit sopivat karakterisointiin hyvin, mikäli kitinaasilla on aktiivisuutta kitosaanisubstraatille. Tablettien käyttö analyyseissä on helppoa ja analyysi on nopea. Kitosaanin liukeneminen happamassa pH:ssa aiheuttaa kuitenkin haastetta happamien entsyymien analysoimiselle, joten tablettitestin luotettavuudesta tulee tehdä lisäkokeita. Analyysimenetelmän kehittämistä jatketaan testaamalla substraatteina erilaisia puhdistettu-

ja kitiinejä ja pyritään löytämään lisää menetelmiä, joilla erityyppisten kitinaasien ominaisuuksia saadaan analysoitua luotettavasti.

Lähteet

- 1 Duo-Chuan, Li. 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161, s. 345 - 360.
- 2 Yritysesittely. Verkkodokumentti. Roal Oy.
<<http://www.roal.fi/yritys/yritysesittely.html>>. Luettu: 12.1.2016.
- 3 Chemically Modified Carbohydrates. 2001. Verkkodokumentti. Sinauer Associates, Inc. <<http://www.blc.arizona.edu/courses/schaffer/182/chitin.htm>>. Luettu 5.4.2016.
- 4 Chavan S. B. & M. V. Deshpande. 2013. Chitolytic Enzymes: An Appraisal as a Product of Commercial Potential. *Biotechnology Progress* 29, s. 833 - 846.
- 5 Merzendorfer H. & L. Zimoch. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology* 206, s. 4393 - 4412.
- 6 Seidl, V., Huemer, B., Seiboth, B. & Kubicek, Christian P. 2005. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS Journal* 272/22, s. 5923 - 5939.
- 7 Hamid R., M.A. Khan, M. Ahmad, M.M. Ahmad, M.Z. Abdin, J. Musarrat & S. Javed. 2003. Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 5, s. 21 – 29.
- 8 Brzezinska, M.S. & U. Jankiewicz. 2014. Chitinolytic Microorganisms and Their Possible Application in Environmental Protection. *Current Microbiology* 68, s. 71 - 81.
- 9 Lorito, M. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. Teoksessa: *Trichoderma & Gliogladium 2. Enzymes, biological control and commercial applications*. Edited by G. E. Harman ja C.P. Kubicek. s. 74.
- 10 Lorito, M. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. Teoksessa: *Trichoderma & Gliogladium 2. Enzymes, biological control and commercial applications*. Edited by G. E. Harman ja C.P. Kubicek. s. 73 - 99.
- 11 Hartl, L., S. Zach & V. Seild-Seiboth. 2012. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 93, s. 533 - 543.
- 12 Somashekar D. & R. Joseph. 1996. Chitosanases - Properties and applications: A review. *Bioresource Technology* 55, s. 35 – 45.

- 13 Tiekartta Suomen proteiiniomavaraisuuden parantamiseksi. 2015. Verkkodokumentti. VTT. <<http://www.vtt.fi/inf/pdf/visions/2015/V6.pdf>>. Luettu 5.4.2016.
- 14 Harman G.E., R.M. Broadway, A. Tronsmo & M. Lorito. 1992. Purified chitinases and use thereof. Verkkodokumentti. <<http://www.google.com/patents/US5173419>>. Luettu 25.2.2016.
- 15 Gveroska, B. & J. Ziberoski. 2012. *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternate* on tobacco. Applied Technologies & Innovations 7, s. 67 - 76.
- 16 Chitinase A. Verkkodokumentti. Patent Auction. <<http://www.patentauction.com/patent.php?nb=10995>>. Luettu 25.2.2016.
- 17 von Weymarn, Niklas. Entsyymit ja niiden tuotanto. Verkkodokumentti. <<http://www.btnk.fi/files/pdf/weymarn.pdf>>. Luettu 16.1.2016.
- 18 Carter G.L., D. Allison, M.W. Rey & N.S. Dunn-Coleman. 1992. Chromosomal and genetic analysis of the electrophoretic karyotype of *Trichoderma reesei*: mapping of the cellulose and xylanase genes. Molecular Microbiology 6, s. 2167 - 2174.
- 19 Peterson, R. & H. Nevalainen. 2012. *Trichoderma reesei* RUT-C30 - thirty years of strain improvement. Microbiology 158, s. 58-68.
- 20 Seidl, V. & B. Seiboth. 2010. *Trichoderma reesei*: genetic approaches to improving strain efficiency. Biofuels 1(2), s. 343 - 354.
- 21 Paloheimo, M., T. Haarmann, S. Mäkinen & J. Vehmaanperä. 2016. Production of Industrial Enzymes in *Trichoderma reesei*. Teoksessa: Gene expression systems in fungi: Advancements and applications. Springer. Edited by Schmoll, M. ja D. Dattenböck. Painossa.
- 22 Mäntylä M., M. Paloheimo & P. Suominen. 1998. Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei*. Teoksessa: *Trichoderma & Gliogladium 2*. Enzymes, biological control and commercial applications. Edited by G. E. Harman ja C.P. Kubicek. s. 291 - 308.
- 23 Kubicek, C.P. & M.E. Penttilä. 1998. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzyme by *Trichoderma*. Teoksessa: *Trichoderma & Gliogladium 2*. Enzymes, biological control and commercial applications. Edited by G. E. Harman ja C.P. Kubicek. s. 49 - 68.
- 24 Penttilä, Merja. 1998. Heterologous protein production in *Trichoderma*. Teoksessa: *Trichoderma & Gliogladium 2*. Enzymes, biological control and commercial applications. Edited by G. E. Harman ja C.P. Kubicek. s. 365 - 379.

- 25 Penttilä, M., H. Nevalainen, M. Rättö, E. Salminen & J. Knowles. 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61, s. 155 - 164.
- 26 Karhunen T., A. Mäntylä, K.M.H. Nevalainen & P.L. Suominen. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. *Molecular Genetics and Genomics* 241, s. 515 - 522.
- 27 Joutsjoki, V.V., T.K. Torkkeli & K.M.H. Nevalainen. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resinae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. *Current Genetics* 24, s. 223 - 228.
- 28 In-Fusion Cloning FAQs. Verkkodokumentti. Clontech.
<http://www.clontech.com/US/Products/Cloning_and_Competent_Cells/Cloning_Resources/FAQs/In-Fusion_Cloning?gclid=CjwKEAiAgKu2BRDu1OGw3-KXokwSJAB_Yy2QdZvzqDX0NFN7WGc26D6vPbRAkhW0u7Q8udLmR-683hoCJ23w_wcB>. Luettu 14.3.2016.
- 29 A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Verkkodokumentti. Bio-Rad.
<<https://fi.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>>. Luettu 3.2.2016.
- 30 Analyysiohje. 2009. Proteiininääritys Tecan Freedom EVO:lla. Roal Oy.
- 31 Fanglian He. 2011. Bradford Protein Assay. Verkkodokumentti. <<http://www.bio-protocol.org/e45>>. Luettu 27.3.2016.
- 32 Product information. Chitinase Assay Kit. Sigma-Aldrich.
- 33 Product information. Assay of chitosanase using chitozyme tablets. Megazyme.
- 34 Zhu X., Y. Zhou & J. Feng. 2007. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5. *Journal of Zhejiang University Science* 8(11), s. 831 - 838.
- 35 Romanazzi, G., F. M. Gabler, D. Margosan, B. E. Mackey & J. L. Smilanick. 2009. Effect of Chitosan Dissolved in Different Acids on Its Ability to Control Postharvest Gray Mold of Table Grape. *Postharvest Pathology and Mycotoxins* 99, s. 1028 - 1036.

Digestiotuotteet.

Sekvenssien perusteella lasketut DNA-palojen koot tarkistusdigestiosta *HindIII*-entsyymillä:

Plasmidi	Fragmenttien koot
vektori	140 + 1189 + 3305 + 3363 bp
pALK4127	140 + 1189 + 3305 + 4983 bp
pALK4128	140 + 1189 + 3305 + 4741 bp
pALK4129	140 + 1189 + 3305 + 4550 bp
pALK4130	140 + 1189 + 3305 + 4641 bp
pALK4131	140 + 230 + 888 + 1189 + 3282 + 3305 bp
pALK4132	140 + 862 + 1189 + 3305 + 3849 bp

Sekvenssien perusteella lasketut DNA-palojen koot tarkistusdigestioista:

Plasmidi	Entsyymi	Fragmenttien koot
pALK4127	<i>NotI</i>	2649 + 6968 bp
pALK4127	<i>BamHI</i>	1048 + 8569 bp
pALK4127	<i>PstI</i>	653 + 8964 bp
pALK4128	<i>NotI</i>	2649 + 6726 bp
pALK4128	<i>XhoI</i>	75 + 437 + 479 + 8384 bp
pALK4129	<i>NotI</i>	2649 + 6535 bp
pALK4129	<i>SalI</i>	483 + 8701 bp
pALK4129	<i>BamHI</i>	314 + 8870 bp
pALK4130	<i>NotI</i>	2649 + 6626 bp
pALK4130	<i>KpnI</i>	703 + 8572 bp
pALK4130	<i>ScaI</i>	3767 + 5508 bp
pALK4131	<i>NotI</i>	2649 + 6385 bp
pALK4131	<i>BamHI</i>	393 + 8641 bp
pALK4131	<i>EcoRV</i>	477 + 690 + 1219 + 1295 + 5353 bp
pALK4132	<i>NotI</i>	2649 + 6696 bp

Taulukon yliviivatut arvot ovat tuottokasettien koot, jotka saatiin *NotI*-digestiolla.

PCR- ja sekvensointialukkeet

PCR-alukkeet:

Kitinaasigeeni	5'- primer		<i>Gene spec req: 18-25</i>	<i>req: 40-60</i>	<i>req: 58- 65</i>	3'- primer		<i>Gene spec req: 18-25</i>	<i>req: 40-60</i>	<i>req: 58- 65</i>	Delta- Tm <4°C
	Name	Total length	Length	G/C content	Tm	Name	Total length	Length	G/C content	Tm	
Chi18-6	fch-1	57	28	43	58,5	fch-2	41	25	56	61,0	2,5
Chi18-11	fch-3	55	26	54	61,1	fch-4	38	22	59	58,6	2,5
Chi18-12	fch-5	52	23	57	58,8	fch-6	43	27	48	59,7	0,9
Chi18-13	fch-7	55	26	50	59,5	fch-8	41	25	52	59,3	0,2
Chi18-15	fch-9	57	28	46	59,9	fch-10	43	27	48	59,7	0,2
Chi18-17	fch-11	55	26	46	58,0	fch-12	42	26	50	59,5	1,5

req = In-Fusion HD Cloning -kitin suositus

Sekvensointialukkeet:

Kitinaasigeeni	pALK-plasmidi	Sijainti plasmidisekvenssissä	Primeri	Sekvenssi
Chi18-6	pALK4127	2511	fch-13	CGTCGTCTACTATGCTGACTG
		2784	fch-14	GGGCAGATGAAGAGAAGATG
		3132	fch-15	AGTACGCGAGCCTCCACAAC
		3401	fch-16	AAGATCATCCTCGGCATCCC
Chi18-11	pALK4128	2450	fch-17	AACTCGGGCACTTGGTACAG
		2750	fch-18	ATGGCGAGGACTACAAGGTG
		3081	fch-19	AACGAAACCACGCATCACAC
Chi18-12	pALK4129	2402	fch-20	CAGCGCCTCTCGTTCTACTG
		2701	fch-21	CGCAGAGCCGACATCAAGAC
		2978	fch-22	CCACCGACAGCAACAAGAAG
Chi18-13	pALK4130	2387	fch-23	CCTTCCTCAGCCGCTTCTTC
		2662	fch-24	AACCCTACCCTCCGTCCCTTTG
		2976	fch-25	ACATTGCCAGTCCGGCTTC
Chi18-15	pALK4131	2464	fch-26	CCTGATGGAACAGCCCTTTG
		2733	fch-27	ATCACAGCCAATCTGATCC
		3050	fch-28	TTCCGTACAGCATGCAAGTC
Chi18-17	pALK4132	2437	fch-29	GCCAGAATCGCCTCTCATAC
		2745	fch-30	GTTCAGAGCGGCAACAGCAC
		3073	fch-31	CCAACAAGAACGCAAAGGTC
		2855	fch-32	GCTGCGAAGCTTGATTGATG